



BACHELORARBEIT

Herr
Paul Prentkowski

**Optimierung und
Standardisierung eines
NK-Zellfunktionsassays für die
Routinediagnostik -
Normwertentwicklung**

2011

BACHELORARBEIT

Optimierung und Standardisierung eines NK-Zellfunktionsassays für die Routinediagnostik - Normwertentwicklung

Autor:
Paul Prentkowski

Studiengang:
Biotechnologie / Bioinformatik

Seminargruppe:
BI08w2-B

Erstprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus

Zweitprüfer:
Dipl. Biotechnologin Franka Kahlenberg

Einreichung:
Mittweida, 14.10.2011

BACHELOR THESIS

Optimization and standardisation of an nk cell function assay for routine diagnostic investigation – development and evaluation of standard value

author:

Mr. Paul Prentkowski

course of studies:

Biotechnology / Bioinformatics

seminar group:

BI08w2-B

first examiner:

Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus

second examiner:

Dipl. Biotechnologin Franka Kahlenberg

submission:

Mittweida, 14.10.2011

Bibliografische Angaben

Prentkowski, Paul:

Optimierung und Standardisierung eines NK-Zellfunktionsassays für die Routinediagnostik -
Normwertentwicklung

60 Seiten, Hochschule Mittweida, University of Applied Sciences,
Fakultät Mathematik, Naturwissenschaften, Informatik, Bachelorarbeit, 2011

Referat

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) bilden die erste Verteidigungslinie gegen Virusinfektionen und entartete Zellen. Für die immunologische Routinediagnostik ist es von größter Bedeutung möglichst genaue Aussagen über die zytotoxische NK-Zellaktivität zu treffen. Deshalb musste der bereits etablierte NK-Zelltoxizitätstest optimiert werden. Für die Entwicklung von laborinternen Normwerten wurden 14 gesunde Probanden auf ihre NK-Zelltoxizität getestet. Aus den Werten konnten erfolgreich Referenzbereiche erstellt und eine Normalverteilung ermittelt werden.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Grundlagen.....	2
2.1 Natürliche Killer-Zellen (engl.: natural killer cells)	2
2.2 Buffy Coat	3
2.3 Zelllinie K562	4
2.4 Calcein.....	4
2.5 Interleukin-2 (IL-2)	4
2.6 Triton X-100	5
2.7 Trypanblau-Färbung.....	5
2.8 Neubauer-Zählkammer	5
2.9 Dichtegradientenzentrifugation.....	6
2.10 Normwerte.....	6
3 Geräte- und Chemikalienverzeichnis	8
4 Methoden	10
4.1 Lymphozytenpräparation	10
4.2 Einfrieren humaner Lymphozyten	11
4.3 Auftauen kryokonservierter humaner Lymphozyten	11
4.4 NK-Zellzytotoxizitätstest	12
4.5 Verifizierung und Validierung	13
4.6 Qualitätsmanagementsystem und Erstellen von Standardarbeitsanweisungen (SOP's).....	15
5 Ergebnisse	17
5.1 Fluoreszenzendpunktbestimmung.....	17
5.2 Erstellung einer Standardarbeitsanweisung	18
5.3 Etablierung der zu verwendenden K562-Zellpräparationen	18
5.4 Etablierung des zu verwendenden Mediums für die Kryokonservierung von PBMC's.....	19
5.5 Verifizierung und Validierung unter Verwendung verschiedener NK- Zellkonzentrationen.....	19
5.6 Auswirkung von Interleukin-2 auf die NK-Zelltoxizität in der Praxis	20

5.7	Vergleich der NK-Zelltoxizitäten zwischen Messungen frisch aufbereiteter und eingefrorener Probandenblute	20
5.8	Etablierung von Normwerten	21
6	Auswertung und Diskussion	23
6.1	Allgemeine Auswertung der Rohdaten	23
6.2	Etablierung der K562-Zellpräparationen	24
6.3	Etablierung des zu verwendenden Mediums für die Kryokonservierung von PBMC's.....	25
6.4	Verifizierung und Validierung unter Verwendung verschiedener NK-Zellkonzentrationen.....	26
6.5	Auswirkung von Interleukin-2 auf die NK-Zelltoxizität in der Praxis	28
6.6	Vergleich der NK-Zelltoxizitäten zwischen Messungen frisch aufbereiteter und eingefrorener Probandenblute	29
6.7	Etablierung von Normwerten	31
7	Zusammenfassung und Ausblick	33
	Tabellenverzeichnis.....	35
	Abbildungsverzeichnis	43
	Literaturverzeichnis.....	44
	Anhang	48

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AM	Acetoxymethyl-
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAkkS	Deutsche Akkreditierung GmbH
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dr. med.	Doktor der Medizin (lat. doctor medicinae)
FKS	Fetales Kälberserum
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HSC	Hämatopoetische Stammzelle (engl. hematopoietic stem cell)
IL-2	Interleukin-2
LSM	Lymphozyten-Separationsmedium
Meas. Params	Messparameter (engl. measurement params)
MW	Mittelwert
Negativk.	Negativkontrolle
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle (engl. natural killer cell)
NKT	NK-Zelltoxizität
PBMC	Mononukleare Zelle des Blutes (engl. peripheral blood mononuclear cell)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
Positivk.	Positivkontrolle
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
SOP	Standardarbeitsanweisung (engl. standard operating procedure)
STABW	Standardabweichung
Tab.	Tabelle

VK Variationskoeffizient

1 Einleitung und Zielsetzung

In der Medizin kann eine korrekte Diagnose durch den Arzt bei seltenen Erkrankungen ohne spezifisches Krankheitsbild häufig erst nach einer längeren Anamnese erstellt werden. Für die Diagnosefindung müssen in diesen Fällen mehrere Untersuchungen und Tests zu unterschiedlichen Krankheitsursachen durchgeführt werden. Eine zu geringe Anzahl oder verminderte Aktivität der Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) kann beispielsweise eine erhöhte Anfälligkeit des Patienten gegenüber Infektionen mit Viren, Bakterien oder anderen Mikroorganismen verursachen [1]. Zu diesem Zweck werden Heparinblutproben des Patienten an die entsprechende diagnostische Stelle geschickt, im Fall des Uniklinikum Leipzig wird das Blut zur Untersuchung an das Institut für Klinische Immunologie, Department für Diagnostik, gegeben. Mitarbeiter dieses spezialdiagnostischen Labors bestimmen durch eine Fluoreszenzbestimmung die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen. Da eine Bestimmung der NK-Zelltoxizität nur selten angefordert wird, werden aus Gründen der Wirtschaftlichkeit die Patientenblute gesammelt und in Abstand von vier Wochen Tests durchgeführt.

Ziel der Bachelorarbeit ist es, den bereits etablierten NK-Zelltoxizitätstest zu optimieren, zu standardisieren und laborinterne Normwerte zu ermitteln, um eine optimale Auswertung der Ergebnisse zu ermöglichen. Dazu gehören vor Beginn und während der Normwertetablierung abweichend von der bereits validierten Methode weitere Komponenten hinzugefügt; so wurde der Test mit verschiedenen NK-Zellverdünnungen erweitert und neu verifiziert und validiert. Zusätzlich wurde eine Etablierung der K562-Zellpräparation durchgeführt, um ggf. Einsparungen beim Zeitaufwand zu ermöglichen, und es wurde überprüft, ob eine Anreicherung mit dem T-Zellwachstumsfaktor Interleukin-2 eine Steigerung der NK-Zellaktivität zur Folge hatte. Auf Grund von einigen Problemen, die während den Etablierungs-, Verifizierungs- und Validierungsphasen auftraten, musste ein Troubleshooting vollzogen werden. Die Methoden wurden mit verschiedenen humanen Spenderproben durchgeführt.

Zur besseren Übersichtlichkeit der Arbeit wurden die Ergebnisse entsprechend dem zeitlichen Ablauf der Versuchsdurchführungen beschrieben und diskutiert.

2 Grundlagen

2.1 Natürliche Killer-Zellen (engl.: natural killer cells)

Etwa 5 bis 10% der Blutlymphozyten werden durch die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) repräsentiert. Dies sind große granulare Zellen des Blutes. Ihre Funktion liegt im Aufspüren und Abtöten von fremden Zellen, Tumorzellen oder Virus-infizierten Zellen. NK-Zellen werden wie auch T- und B-Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) des Knochenmarks gebildet. Welche Lymphozyten sich aus den HSC differenzieren, wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren gesteuert. So können sog. Helix-loop-helix-Transkriptionsfaktoren durch Binden an die DNA je nach Art des Transkriptionsfaktors die Differenzierung von T- oder B-Zellen einleiten. Wenn dagegen das Protein Id2 an die DNA bindet, wird das Anknüpfen der Helix-loop-helix-Transkriptionsfaktoren und somit die Entwicklung von T- oder B-Zellen unterbunden. Im Gegensatz dazu wird die Differenzierung von NK-Zellen aus den HSC gefördert. Während dieser Differenzierung durchläuft die NK-Zelle mehrere Reifungsphasen, in der sich sowohl die spezifischen NK-Rezeptoren und Antigene als auch die lytische Granula mit ihren Perforinen und Granzymen bilden [2]. Ausdifferenzierte NK-Zellen besitzen Rezeptoren aus den Proteinfamilien der Immunglobulin-ähnlichen und der Lektin-ähnlichen Familie. Innerhalb der Immunglobulin-ähnlichen Familie existieren zwei Typen von Rezeptoren, die aktivierenden und inhibierenden NK-Rezeptoren. „Natural cytotoxicity receptors“ (NCR) geben bei Kontakt mit ihren Liganden aktivierende Signalkaskaden über sog. Adapterproteine an die NK-Zelle weiter. Killer-Immunglobulin-like-Rezeptoren (KIRs) können ebenfalls aktivierend aber auch hemmend auf die Zelle wirken, sie erkennen humane Leukozyten-Antigene der Klasse I (HLA-I). In welcher Form diese Rezeptoren wirken, wird durch ihre intrazytoplasmatischen Domänen bestimmt. Während kurze KIRs aktivierend wirken, besitzen lange KIRs auf Grund eines Tyrosin-haltigen Sequenzmotives einen inhibierenden Effekt. Auch Rezeptoren aus der Familie der Lektin-ähnlichen können je nach Aufbau der heterodimeren Kette aktivierend oder inhibierend wirken. Dabei interagieren die inhibierenden Rezeptoren ebenfalls mit den HLA-Klasse-I-Molekülen. Das aktivierende Heterodimer erkennt dagegen ein HLA-ähnliches Molekül, welches häufig von Tumorzellen auf der Oberfläche präsentiert wird.

Diese Vielzahl von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren hat zur Folge, dass die NK-Zelle stets aktivierende und hemmende Signale bekommt. Ob die NK-Zelle die Zell-Lyse induziert, hängt damit zusammen, welche Signalkaskade stärker wirkt. Inhibierende KIRs besitzen eine höhere Affinität als aktivierende KIRs, sodass bei Kontakt mit gesunden Zellen

stets die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen unterbunden wird. Jede gesunde kernhaltige Zelle besitzt auf ihrer Oberfläche HLA-Antigene der Klasse-I. Virusbefallenen oder entarteten Zellen fehlen dagegen häufig einige ihrer HL-Antigene und synthetisieren Proteine, die aktivierende Signale liefern, wodurch die NK-Zelle bei Kontakt mit solchen Zellen nicht mehr inhibiert wird.

Dementsprechend gibt es eine große Anzahl von sich in Bau und Wirkungsweise unterscheidenden Rezeptoren, wobei jede einzelne NK-Zelle nur einen geringen Anteil der möglichen inhibierenden Rezeptoren besitzt. Die Gesamtheit aller NK-Zellen im humanen Organismus deckt die ganze Breite dieser Rezeptoren ab [2, 3, 4, 5].

Hat eine NK-Zelle über die auf der Oberfläche exprimierten Rezeptoren an z.B. eine Tumorzelle gebunden und einen Überschuss an aktivierenden Signalen erhalten, leitet diese das zytotoxische Programm ein. Die NK-Zelle schüttet daraufhin die in ihren Granula gelagerten Perforine und Granzyme aus. Nachdem sich auf Grund des Perforins Poren in der Membran der Zielzelle gebildet haben, gelangen die Granzyme über die Endozytose ins Zellinnere und aktivieren im Zellkern die Apoptose, indem diese Proteasen u.a. Caspasen, Apoptose-fördernde Proteine, aktivieren [6, 7].

2.2 Buffy Coat

“Buffy Coat” (BC) wird das aus dem Blut durch Zentrifugation gewonnene Leukozyten- und Blutplättchen-Konzentrat genannt. Bei dieser Separierung werden Mehrbeutelsysteme verwendet, d.h. zur kontaminationsfreien Trennung der Blutkomponenten Gefrierplasma, Erythrozyten-, Thrombozytenkonzentrat und „Buffy Coat“ werden vier Beutel mittels Schläuchen miteinander verbunden [8]. Aus dem BC wurden anschließend die PBMC's gewonnen, kryokonserviert und im flüssigen Stickstoff eingefroren. Die dabei eingestellte Zellzahl betrug etwa 2×10^7 Zellen.

2.3 Zelllinie K562

Im Jahr 1975 wurde die erste humane myeloische Tumorzelllinie K562 etabliert. Fünf Jahre zuvor wurden die Zellen aus dem Blut einer 53-jährigen Frau isoliert, welche an chronischer myeloischer Leukämie erkrankt war. K562-Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass auf ihrer Oberfläche keine Immunoglobuline exprimiert sind [9]. Dies hat zur Folge, dass sie durch NK-Zellen erkannt und lysiert werden. Aus diesem Grund werden K562-Zellen auch häufig als Targetzellen in Verbindung mit Tests von zytotoxischen Aktivitäten von NK-Zellen verwendet [10].

2.4 Calcein

Der Fluoreszenzfarbstoff Calcein kann in zwei verschiedenen Transformationen vorkommen. Außerhalb der Zelle besitzt der mit vier Acetoxymethylgruppen veresterte Fluoreszenzfarbstoff aufgrund seiner funktionellen Gruppen die Eigenschaften, dass er unpolar, membrangängig und nicht fluoreszierend ist. Sobald er jedoch die Zellmembran passiert und ins Zytoplasma gelangt, spalten sich diese Gruppen durch zelluläre, unspezifische Esterasen ab und das Calcein bildet mit den im Plasma enthaltenen Calcium-Ionen einen Chelatkomplex, welcher nicht mehr membrangängig ist, aber stark im grünen Bereich fluoresziert [11].

2.5 Interleukin-2 (IL-2)

IL-2 ist ein immunregulierendes Zytokin, welches nach antigener oder mitogener Stimulation durch T-Zellen ausgeschüttet wird [12]. Zur Aktivierung des Proteins muss das Interleukin-2 an einen spezifischen Rezeptor binden. Solche Rezeptoren befinden sich primär auf T-Zellen und bestehen aus drei Untereinheiten, der α -, β - und γ -Untereinheit. Die β - und γ -Untereinheit liegen ständig auf der T-Zelle vor, während die α -Untereinheit erst bindet, sobald die T-Zelle durch ein Antigen aktiviert wird. Erst nach der Vervollständigung des Rezeptors (heterotrimere Form) ist die Affinität des IL-2 zu seinem Liganden hoch genug, damit eine Immunantwort über komplexe Signalkaskaden reguliert werden kann. [13] IL-2 dient als Wachstumsfaktor für T-Zellen, erhöht die NK-Zellaktivität, ruft Differenzierung von regulatorischen T-Zellen hervor und verstärkt die Apoptose von CD4⁺-Lymphozyten [14, 15]. Das in der Durchführung verwendete humane Interleukin-2 der Firma SIGMA-

ALDRICH wurde in humanen embryonalen Nierenzellen (293-Zelllinie) exprimiert, besitzt eine molekulare Masse von 15 kDa sowie einen ED₅₀-Wert von ≤ 4 ng/ml [16].

2.6 Triton X-100

Triton X-100 ist ein ungeladenes Tensid, welches häufig zum Lösen von Proteinen verwendet wird. Des Weiteren hält dieses Reagenz die Aktivität von Enzymen stabil. Dieses Detergens wird häufig in geringen Konzentrationen von meist unter 2 % zur Lysierung von Zellen benutzt [17], indem es die Zytoplasmamembran zerstört und somit die Zellbestandteile freisetzt [18].

2.7 Trypanblau-Färbung

Bei dieser Vitalitätsfärbung wird die Eigenschaft von Trypanblau ausgenutzt, dass dieser polyanionische Azofarbstoff abgestorbene Zellen blau färbt, da er nur durch beschädigte Zellmembranen ins Innere der Zelle eindringen kann. Somit werden tote Zellen blau markiert, während lebende Zellen hell über dem bläulichen Hintergrund erscheinen. Aus diesem Grund wird diese Art der Zellfärbung häufig zur Testung der Vitalität von Zellen verwendet. Bei Verwendung des Farbstoffs muss die Beobachtung jedoch in kürzester Zeit nach Zugabe geschehen, da Trypanblau zytotoxisch auf die Zellen wirkt [19].

2.8 Neubauer-Zählkammer

Die von Neubauer entwickelte Zählkammer gehört zu den in der Medizin am meisten verwendeten. Sie dient zur Ermittlung der Teilchenzahl in einem bestimmten Flüssigkeitsvolumen. Die Zellen werden dabei unter einem Mikroskop meist manuell ausgezählt [20]. Für die Bestimmung der absoluten Zellzahlen von Leukozyten und K562-Zellen wurden neben den Ausmessungen der Kammer bzw. der Quadrate auch die Verdünnung mit Trypanblau wie das Volumen des Mediums, in der die Zellzahl ermittelt werden sollte, benötigt.

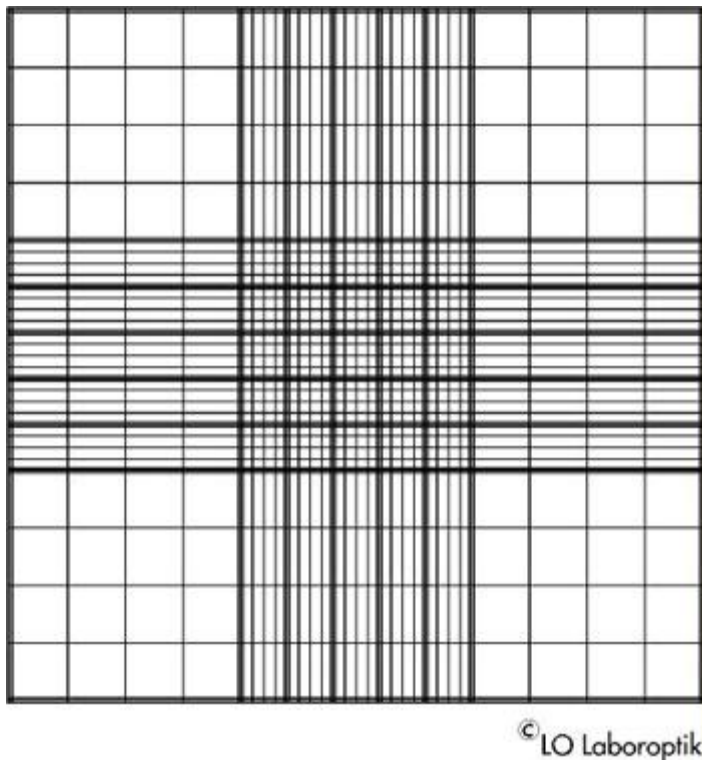


Abbildung 1: Neubauer-Zählkammer

http://zaehlkammer.de/gfx/neubauer_improved.jpg

2.9 Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung eines Separationsmediums wird in der Medizin häufig eingesetzt, um Blut in seine Erythrozyten, PBMCs und Plasma zu trennen. Dafür wird häufig Ficoll-Hypaque oder ein Medium mit sehr ähnlichen Eigenschaften eingesetzt. Die eingestellte Dichte muss dabei geringer sein als die der Erythrozyten und Granulozyten und gleichzeitig jedoch höher als die der PBMC's und der Thrombozyten, denn nur so können nach der Zentrifugation diese Bestandteile getrennt unter- und oberhalb des Separationsmediums vorliegen [21].

2.10 Normwerte

Unter Normwerten werden Bezugsgrößen verstanden, mit denen Testresultate hinsichtlich ihrer Bedeutung verglichen werden. Eine Beurteilung von Ergebnissen kann erst in Relation zu anderen Ergebnissen vollzogen werden [22]. Die Gesamtheit der Normwerte wird als Referenzbereich bezeichnet, der Bereich, in dem die Werte von 95 % der gesunden Menschen liegen. Bei der Etablierung eines Referenzbereiches mit Laborwerten werden Unter- und

Obergrenzen gebildet, 2,5 % der Werte von Gesunden liegen unterhalb der Untergrenze und 2,5 % oberhalb der Obergrenze. Im optimalen Fall ergibt sich beim Erstellen eines Histogramms aus den Laborwerten eine Normalverteilung, die meisten Werte liegen für diese Verteilung um den Mittelwert (MW) (Abb. 2). 95 % der Werte liegen innerhalb der doppelten Standardabweichung (STABW).

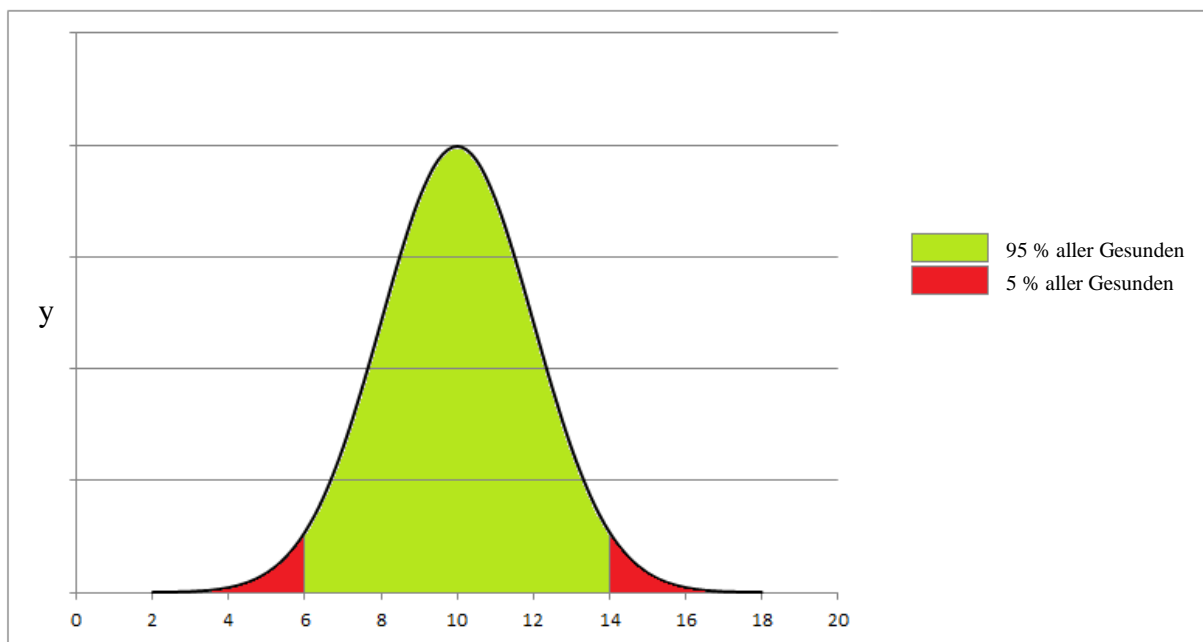


Abbildung 2: Dichtefunktion der Normalverteilung

Für die Erstellung von Normwerten werden gesunde Menschen verschiedenen Alters und beider Geschlechter benötigt. Auch Messungen an Personen aus verschiedenen Bevölkerungsschichten können sinnvoll sein.

3 Geräte- und Chemikalienverzeichnis

Geräte:

- 2 µl - 20 µl Pipette – Eppendorf, Hamburg
- 10 µl - 100 µl Pipette – Eppendorf, Hamburg
- 200 µl - 1000 µl Pipette – Eppendorf, Hamburg
- Heracell 150i CO₂ Incubator (37 °C und 5 % CO₂) – Thermo Scientific, München
- Inverse Mikroskop Axiovert 25 – Carl Zeiss MicroImaging, Jena
- Kryoröhrchen – Carl Roth, Karlsruhe
- Neubauer-Zählkammer – Carl Roth, Karlsruhe
- pipetus®-akku – Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
- Rotina 46 RS – Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
- Rotina 48 R – Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
- SPECTRAFlour Plus – Tecan, Crailsheim
- Sterilbank – Clean Air Technik, Woerden, Niederlande

Verbrauchsmaterialien:

- 10 ml Serologische Pipetten, steril – Sarstedt, Nümbrecht
- 15 ml Einwegröhrchen, steril – BD Biosciences, Heidelberg
- 50 ml Einwegröhrchen, steril – Sarstedt, Nümbrecht
- 96-well-Rundbodenplatte, transparent – Greiner BIO-ONE, Frickenhausen
- Cellstar® 96-well-Flachbodenplatte, schwarz – Greiner BIO-ONE, Frickenhausen
- Cellstar® 96-well-Flachbodenplatte, transparent – Greiner BIO-ONE, Frickenhausen
- Pipettenspitzen, steril – Sarstedt, Nümbrecht

Chemikalien:

- Calcein, AM *Ultra Pure Grade* (1 mg/ml), steril – AnaSpec Inc., Fremont, USA
- Dimethylsulfoxid (DMSO), steril – AppliChem, Darmstadt
- Gentamicin (10 mg/ml), steril – PAA Laboratories, Cölbe
- Inaktiviertes fetales Kälberserum, steril – PAN Biotech, Aidenbach
- Interleukin-2 human, HumanKine™, steril – SIGMA-ALDRICH®, München
- Lymphozyten-Separations-Medium 1077 (LSM), steril – PAA Laboratories, Cölbe
- Phosphat-gepufferte Salzlösung, steril – PAA Laboratories, Cölbe

- RPMI-1640 mit 1 % L-Glutamin, steril – PAA Laboratories, Cölbe
- Triton[®] X-100 (1 %ig), steril – Ferak, Berlin
- Trypanblau (0,1 %ig) – SIGMA-ALDRICH[®], München

4 Methoden

4.1 Lymphozytenpräparation

Die Lymphozytenseparation erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation.

5 ml Heparinblut wurde im ersten Schritt im Verhältnis 1:1 mit 5 ml PBS verdünnt. Darauf folgte ein langsames Aufschichten des Blutes ohne Vermischung auf 3 ml Lymphozyten-Separations-Medium (LSM), welches im Vorfeld in einem 15 ml Einwegröhrchen vorgelegt wurde. Nach der Zentrifugation für 20 Minuten bei Raumtemperatur und 1750 rpm (Rotina 38 R) mit eingestellter Bremse sowie dem Anlauf auf eins, haben sich die typischen Schichten gebildet. Am Boden des Einwegröhrchens lagen die Granulozyten und die Erythrozyten in Form eines Pellets vor. Darüber waren drei flüssige Phasen zu erkennen. In der ersten befand sich das LSM, darauf, in der Interphase, die Lymphozyten und Monozyten und in der obersten Schicht das Blutplasma.

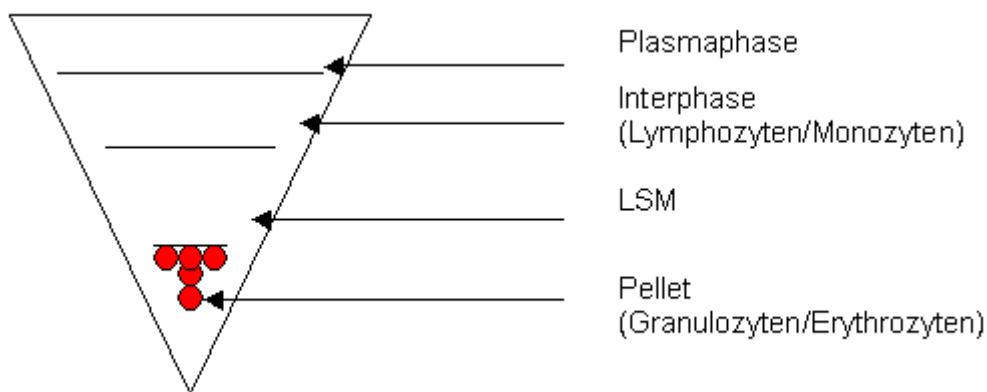


Abbildung 3: Dichtegradientenzentrifugation mittels LSM

Der Lymphozytenring wurde mittels einer Serumpipette vorsichtig herausgenommen, in ein 50-ml-Einwegröhrchen überführt und im Anschluss auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. Nachfolgend wurde wieder bei Raumtemperatur für 10 Minuten und bei 1500 rpm (Rotina 38 R) sowie eingestellter Bremse und Anlauf auf neun zentrifugiert, worauf der Überstand verworfen, das Pellet resuspendiert und mit 50 ml PBS wieder aufgefüllt wurde. Anschließend wurde nach erneuter Zentrifugation bei gleichen Zentrifugeneinstellungen, jedoch auf 1250 rpm (Rotina 38 R) verminderter Umdrehungszahl, der Überstand wieder verworfen und das Pellet in RPMI-Medium mit 10 % inaktivierten FKS resuspendiert.

Nun konnten die separierten Lymphozyten eingefroren oder frisch weiterverwendet werden [23].

4.2 Einfrieren humaner Lymphozyten

Das Einfrieren humaner Lymphozyten wurde häufig im Anschluss an die Lymphozytenpräparation durchgeführt.

Die separierten Lymphozyten wurden mit je 900 µl kaltem RPMI-Medium mit 10 % inaktivierten FKS aufgenommen und im Anschluss in mit 100 µl DMSO gefüllten Kryoröhrchen gegeben. Die Kryoröhrchen wurden sofort in eine mit Iso-Propanol gefüllte Nalgene Einfrierbox, welche im Kühlschrank für mindestens 4 Stunden bei 2-8 °C gelagert wurde, überführt und in einen –80 °C Gefrierschrank gestellt. Zuvor wurden sie mit Barcodeetiketten patientenspezifisch gekennzeichnet. Bei einer Lagerung der Zellen von mehr als vier Wochen wurden sie zur Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt [24].

4.3 Auftauen kryokonservierter humaner Lymphozyten

Nach der Entnahme der kryokonservierten Zellen aus dem flüssigen Stickstoff wurden die aufzutauenden Kryoröhrchen in ein zuvor bereitgestelltes Becherglas mit warmem Wasser überführt. Während des Auftauprozesses wurden 1 ml RPMI-Medium mit 10 % inaktivierten FKS in 15-ml-Röhrchen vorgelegt. Sobald die Zellsuspension im Kryoröhrchen zu etwa 50 % aufgetaut war, wurden diese in das bereits vorgelegte Medium überführt und die Röhrchen auf 5 ml mit Medium aufgefüllt. Im Anschluss wurden die Röhrchen bei 1400 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, nach Verwerfen des Zellüberstandes mit 10 ml Medium resuspendiert und zur weiteren Verwendung die Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung und Verwendung einer Neubauer-Zählkammer bestimmt [25].

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen} * \frac{1}{\text{Tiefe [mm]}}}{\text{Fläche [mm}^2\text{]} * \text{Verdünnung}}$$

Fläche eines Großquadrates: 1 mm²

Tiefe der Zählkammer: 0,1 mm

Verdünnung: 2

4.4 NK-Zellzytotoxizitätstest

Zu Beginn des Versuchsansatzes wurden jeweils die Effektorzellen NK-Zellen und die Targetzellen K562 vorbereitet.

Die NK-Zellen wurden entweder frisch aus Heparinblut von Probanden isoliert, aus schon eingefrorenen PBMC-Proben von Probanden oder aus Buffy Coats aufgetaut und verwendet. Die Lagerung der eingefrorenen Probandenproben erfolgte bei -80 °C und der Buffy Coats in flüssigem Stickstoff. Die Zellzahlen wurden für die Bestimmungen bei verschiedenen Verhältnissen von NK-Zellen zu K562-Zellen auf 2 Millionen, 1 Millionen und 400.000 Zellen pro ml RPMI mit 10 % inaktivierten FKS eingestellt.

Die Zellzahl der K562-Zellen, welche in RPMI-Medium mit 1 % Gentamicin, 1 % L-Glutamin und 10 % inaktiviertem FKS kultiviert wurden, wurde mittels Trypanblau-Färbung in der Neubauer-Zählkammer nach einmaligem Zentrifugieren bei 1500 rpm (Rotina 36 RS) und Waschen bestimmt. Im Anschluss wurde die Zellzahl auf 2×10^6 Zellen pro ml PBS eingestellt. Zu 500 µl dieser Zellsuspension wurden 7,5 µl Calcein (1 mg/ml) gegeben und anschließend bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Zellsuspension aus dem Brutschrank genommen und die Reaktion sofort mit 5 ml RPMI-Medium mit 10 % inaktivierten FKS abgestoppt. Darauf erfolgten zweimalig im Wechsel eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 1400 rpm (Rotina 36 RS) und Waschen der Zellen im Medium. Am Ende wurde die Zellzahl bestimmt und auf 40.000 Zellen pro ml eingestellt, sodass die Verhältnisse von Effektor- zu Targetzellen auf Grund der verschiedenen Konzentrationen der NK-Zellsuspensionen 50:1, 25:1 und 10:1 betrugen [11, 26, 27, 28, 29].

Für den Ansatz mit Interleukin-2 wurden kurz vor dem Pipettieren in die 96-well-Platte 4 ml angefärbte K562-Zellen entnommen und mit 30 µl IL-2 (2 ng/ml) versetzt. Dies wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zuerst wurde 1 ml der K562-Zellsuspension mit 30 µl IL-2 versetzt und anschließend mit den restlichen 3 ml Targetzellsuspension gründlich und vorsichtig durchmischt.

Im Anschluss an die Vorbereitungen der beiden Zellarten wurde der Zytotoxizitäts-Test in einer 96-well-Rundbodenplatte in 4-fach-Bestimmung durchgeführt. Dazu wurden 100 µl der präinkubierten K562-Zellen (mit oder ohne IL-2) pro Kavität vorgelegt und mit 100 µl Medium (Negativkontrolle), Effektorzellen oder 1 %igen Triton X-100 (Positivkontrolle) für drei Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Für die Messung der Fluoreszenzintensität wurden die Zellen für 10 Minuten bei 900 rpm (Rotina 38 R) abzentrifugiert, 100 µl des Überstandes abgenommen und in eine schwarze, Licht

undurchlässige 96-well-Flachbodenplatte überführt. Nachfolgend wurde eine Fluoreszenzendpunktbestimmung mittels des SPECTRAFlour Plus der Firma Tecan durchgeführt. Dazu wurden im „Measurement mode“ in der Registrierkarte „General“ die „Fluorescence Intensity“ in der Registrierkarte „Plate“ die verwendete 96-well-Flachbodenplatte der Firma Greiner aus den voreingestellten Platten und die vom Gerät zu messenden Kavitäten ausgewählt. Die Messparameter wurden wie folgt eingestellt: Excitation = 485 nm, Emission = 535 nm, Integration time = 0,1 sec, Gain = 100 [11, 26, 27, 28, 29, 30].

4.5 Verifizierung und Validierung

Um in einem Labor bei einem neu etablierten Test ein festgelegtes Qualitätsniveau zu erreichen, müssen vor dem Erstellen einer Standardarbeitsanweisung (SOP) und der Inbetriebnahme des Tests Überprüfungen der Wahrheit (Verifizierung) und der Leistungsfähigkeit (Validierung) der Methodik durchgeführt werden. Im Rahmen der Validierung wurde der Test nach wichtigen Akzeptanzkriterien überprüft, zu diesen Kriterien zählen Präzision, Richtigkeit, Linearität bzw. Nachweisgrenze, Spezifität und Sensitivität. Die Präzision beschreibt die Reproduzierbarkeit und Wiederholgenauigkeit des Zytotoxizitätstest mittels Berechnungen von Intraassay- und Interassayvarianz, also die Genauigkeiten innerhalb der Messreihe eines Tages und von Analyseserie zu Analyseserie unterschiedlicher Tage. Bei der Richtigkeit wurde eine systematische Messabweichung ermittelt und bewertet und bei der Linearität der lineare Messbereich des Tests bestimmt. Die Sensitivität gibt den Anteil der korrekt als positiv klassifizierten Objekte an der Gesamtheit der tatsächlich positiven Objekte an und die Spezifität schließt falsch positive Ergebnisse aus.

Im Rahmen der Methodenverifizierung und -validierung wurde für die Intraassay- und Interassayvarianz ein Variationskoeffizient (VK) von maximal 30 % \pm 3 % festgelegt [31]. Die Intra- und Interassays wurden nach folgenden Schemata in Tabellenform erstellt:

Intraassay				Interassay			
NK-Zelltoxizität Proband k	10x [%]	25x [%]	50x [%]	NK-Zelltoxizität Proband k	10x [%]	25x [%]	50x [%]
Messung 1				Tag 1			
Messung 2				Tag 2			
Messung 3				Tag 3			
Messung 4				Tag n			
Mittelwert				Mittelwert			
Standardabweichung (Stichprobe)				Standardabweichung (Stichprobe)			
VK				VK			
Anzahl	4	4	4	Anzahl	n	n	n
Max. erwarteter VK	30±3	30±3	30±3	Max. erwarteter VK	30±3	30±3	30±3
Kriterium erfüllt	ja/nein	ja/nein	Ja/nein	Kriterium erfüllt	ja/nein	ja/nein	Ja/nein

Der Grundaufbau der Tabelle ist für beide Assays gleich, der Tabellenkopf enthält den Probanden, mit dessen Proben die Messung durchgeführt wurde, und die verschiedenen Effektor-Target-Zellen-Verhältnisse, für welche die Fluoreszenzbestimmung durchgeführt wurde. In den Feldern unterhalb des Kopfes wurden die errechneten NK-Zelltoxizitäten (NKT's) eingefügt, vier Werte pro Spalte im Intraassay, auf Grund der 4-fach-Bestimmung, und n Werte im Interassay, da die Anzahl der Analyseserien von Proband zu Proband variierte. Innerhalb der darauffolgenden Zeilen wurden die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten bzw. Intra- und Interassayvarianzen für die einzelnen Verhältnisse berechnet. In der Zeile „Anzahl“ wurde die Summe der NK-Zelltoxizitätsmessungen pro Spalte angegeben, bei „Max. erwarteter VK“ die maximale erlaubte Grenze der Varianzen von 30 % ±3 % und in der letzten Zeile, ob der Variationskoeffizient unterhalb der Grenze lag [32, 33].

Insgesamt wurden Blutproben von 14 Probanden entnommen, von denen für den Interassay 13 Probanden verwendet werden konnten, da Proband 4 nicht ausreichend Blut spenden konnte. Das Alter der Probanden lag zwischen 20 und 51 Jahren, und es wurde angenommen, dass diese zum Zeitpunkt der Blutentnahme gesundheitlich nicht beeinträchtigt waren, sodass die zytotoxischen NK-Zellaktivitäten im normalen Bereich liegen sollten.

4.6 Qualitätsmanagementsystem und Erstellen von Standardarbeitsanweisungen (SOPs)

Die Qualitätssicherung im Bereich Immundiagnostik des Instituts für Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Leipzig AöR wird über ein Qualitätsmanagementsystem gewährleistet. Das Qualitätsmanagementsystem unterliegt der DIN EN ISO 15189 und wird durch die Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH (DAkkS) 18monatig überwacht [34, 35]. Standardarbeitsanweisungen (SOPs) sind schriftlich festgehaltene Standardvorgehensweisen für stationäre, diagnostische oder labortechnische Abläufe. Als Bestandteile des Qualitätsmanagementsystems beschreiben SOPs detailliert die durchzuführenden Arbeitsprozesse, Vorsichtsmaßnahmen und sonstige Maßnahmen, welche in direkter Beziehung zur Prüfung und Bearbeitung von Patientenmaterial stehen [34]. Das Ziel des Qualitätsmanagementsystems liegt in der Wahrung und der Optimierung der Qualität und Kompetenz in einem Betrieb. Die DIN EN ISO 15189 beschreibt dabei die Anforderungen an ein akkreditiertes medizinisches Labor [36].

Nach der Validierung und vor der routinemäßigen Einführung neuer Prüfverfahren muss eine SOP erstellt werden. Die Standardarbeitsanweisung des NK-Zelltoxizitätstest folgt den SOPs 1-014 „Regelung zur Entwicklung neuer Prüfverfahren“ und 1-015 „Validierung neuer Untersuchungsverfahren (Tests in Eigenherstellung)“. Dabei kann der Autor einer SOP jeder autorisierte Mitarbeiter dieses Labors sein. Um eine einheitliche Form zu garantieren, wurde bei der Erstellung nach der DIN ISO 15189-Norm der DAkkS vorgegangen. Jede Seite der SOP enthält in der Kopfzeile den Namen der Prüfungseinrichtung, als Dokumentenart die Standardarbeitsanweisung, eine Kennzeichnung durch die Abkürzung SOP und einer Nummer, den Titel, die Seitenzahl (1 von n; inklusive Anlagen) und die Version in Form von zwei Ziffern. Auf dem Deckblatt sind Angaben zum Ersteller, Prüfer und der Person, welche die SOP freigegeben hat, jeweils mit Name, Datum und Unterschrift enthalten. Die folgende erste Seite beinhaltet das Inhaltsverzeichnis mit Seitenzahl. Auch der Inhalt einer allgemeinen SOP wird nach festen Hauptpunkten gegliedert:

- 1 Titel
- 2 Geltungsbereich
- 3 Änderungshinweise
- 4 Zweck
- 5 Begriffe / Abkürzungen (Erklärung nicht allgemein verständlicher Begriffe)
- 6 Verantwortlichkeiten

- 7 Beschreibung
- 8 Mitgeltende Unterlagen (z.B. andere SOPs, Normen, Gesetze,)
- 9 Anlagen

Zusätzlich zu der Hauptgliederung können Unterpunkte nach Erfordernis verwendet werden. Punkte, welche nicht zutreffen, werden mit „nicht belegt“ oder „nicht zutreffend“ gekennzeichnet.

Nach der Fertigstellung, einem Prüfverfahren und anschließender Freigabe der SOP, wurde diese zur Kennzeichnung als Original und der Zugehörigkeit zum diagnostischen Labor des Instituts für Klinische Immunologie auf spezielles, farbiges Papier gedruckt und in den Ordner „Gültige SOPs“ hinterlegt [34].

5 Ergebnisse

5.1 Fluoreszenzendpunktbestimmung

Nach der Fluoreszenzmessung des SPECTRAFluor Plus wurden die Ergebnisse im Microsoft Excel 2003 wie im Beispiel Abbildung 6 ausgegeben. In der obersten Zeile wurden Informationen zum Messgerät und dem verwendeten Programm dargestellt, wie Name, Seriennummer, Firmware und Version. Darunter folgen weitere Angaben zum Tag und der Uhrzeit, bei der die Messung durchgeführt wurde, zu den eingestellten Messparametern und zu der Temperatur, welche während der Fluoreszenzendpunktbestimmung im Gerät gemessen wurde. Im unteren Abschnitt wurden die gemessenen Rohdaten in einer Tabelle entsprechend der verwendeten 96-well-Platte in 96 Feldern dargestellt.

Für die Zuordnung der einzelnen Werte zu einer Probe, wurde im Vorfeld der Messung ein Schema, welches einer 96-well-Platte entspricht, aufgezeichnet, in dem genau aufgezeigt wurde, welche Proben in welches Well zu pipettieren waren. Die einzelnen Proben wurden in 4-fach-Bestimmung und in verschiedenen NK-Zellen-K562-Zellen-Verhältnissen durchgeführt. Dazu wurden eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle, ebenfalls in 4-fach-Bestimmung, gemessen. In dem Beispiel (Abb. 4) liegt die Negativkontrolle in den Feldern A2 bis D2 und die Positivkontrolle in A3 bis D3. A1 bis D1 beinhalten Leerwerte, da in diese Wells der Platte keine Proben pipettiert wurden. Die Probandenproben wurden in drei Stufen der NK-Zellkonzentration auf die K562-Zellen aufgebracht, den Verhältnissen 50fach, 25fach und 10fach, und wurden dementsprechend in Blöcke von 3 x 4 Feldern pipettiert. Die Spalten 1, 4, 7 und 10 beinhalten Werte für 50fache Verhältnisse, 2, 5, 8 und 11 für 25fache und 3, 6, 9 und 12 für 10fache. Die Felder von A4 bis D6 enthalten beispielsweise die Rohdaten von Proband 1 und E7 bis H9 die Rohdaten von Proband 12.

SPECTRAFluor Plus; Serial number: 94552; Firmware: V 4.40 - 03/99; XFLUOR4 Version: V 4.51												
Date:	12.9.11											
Time:	14:30											
Measurement mode:	Fluorescence Top											
Excitation wavelength:	485 nm											
Emission wavelength:	535 nm											
Gain (Manual):	100											
Number of flashes:	3											
Lag time:	0 µs											
Integration time:	100 µs											
Plate definition file:	GRE96fb.pdf											
Rawdata	Temperature: 23.2 °C											
<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	105	1600	4753	2906	2858	2230	2542	2435	2275	2720	2570	2338
B	91	1558	4863	2817	2723	2206	2574	2418	2126	2771	2698	2211
C	99	1555	4869	2835	2695	2132	2401	2286	2204	2696	2347	2135
D	98	1667	5111	3015	2761	2257	2687	2472	2249	2732	2607	2197
E	2655	2404	2196	2863	2585	2338	3613	3324	2716	3106	2723	2446
F	2652	2403	2195	2947	2633	2274	3877	3533	2694	3215	2898	2546
G	2528	2324	2141	2869	2592	2318	3851	3371	2773	3388	2988	2340
H	2828	2638	2311	2712	2610	2439	4077	3788	2927	3006	3118	2439

Abbildung 4: Ausgabe der Messwerte durch SPECTRAFluor Plus

	Leerwerte
	Proband 1
	Proband 12

5.2 Erstellung einer Standardarbeitsanweisung

Bei der Erstellung der SOP des NK-Zelltoxizitätstest wurde nach dem Muster vorgegangen, welches unter 4.6 „Qualitätsmanagement und Erstellen von Standardarbeitsanweisungen (SOPs)“ beschrieben wurde. Die SOP 4-450 „NK-Zelltoxizität mittels Immunfluoreszenz“ beinhaltet Informationen zu den Hauptpunkten und wurde durch den Laborleiter freigegeben (siehe Anhang).

5.3 Etablierung der zu verwendenden K562-Zellpräparationen

Die Messung der NKTs erfolgte zu Beginn der Versuchsreihen mit unterschiedlich präparierten K562-Zellen. Für die Fluoreszenzendpunktbestimmung wurden NK-Zellen auf frisch aus einer Dauerkultur entnommene und gefärbte K562-Zellen gegeben, sowie auf aufgetaute und frisch gefärbte Targetzellen und auf aufgetaute, aber bereits vor der Kryokonservierung gefärbte Zellen. Die NK-Zellen stammten aus den BCs 11 und 25 und

wurden in drei Zellkonzentrationen (2×10^6 Zellen/ml, 1×10^6 Zellen/ml, 4×10^5 Zellen/ml) zu den K562-Zellen hinzugegeben. Aus den Rohdaten der Fluoreszenzendpunktbestimmung wurden die Mittelwerte und daraus die NKTs berechnet, welche in Tabelle 1 dargestellt sind. Für BC11 erfolgten die Messungen über fünf Tage und für BC25 über vier Tage, da für BC25 keine weiteren Proben für einen 5. Versuchsansatz vorhanden waren. Je höher die NK-Zellkonzentration, welche auf die K562-Zellen gegeben wurde, war, desto größer waren die gemessenen Fluoreszenzwerte und somit die NKTs. Die NKTs innerhalb einer Konzentrationsstufe unterschied sich nur geringfügig zwischen den drei verschiedenen Arten der Targetzellpräparation, für frische Zellen waren sie am geringsten und für nicht vorgefärbte, eingefrorene Zellen am höchsten.

5.4 Etablierung des zu verwendenden Mediums für die Kryokonservierung von PBMC's

Für die Etablierung von Normwerten wurden PBMCs aus Heparinblut von Probanden isoliert. Diese wurden anschließend, da die Proben über mehrere Tage zur Verfügung stehen mussten, zum einen in RPMI-Medium mit 10% inaktivierten FKS und DMSO eingefroren und zum anderen in inaktivierten FKS mit DMSO. Mit beiden Typen von NK-Zellen wurde nach dem Auftauprozess der Zytotoxizitätstest durchgeführt und die NKTs berechnet (Tab. 2). Für Proband 4 wurden zwei Messreihen und für Proband 14 eine Messung mit in RPMI und 10% FKS eingefrorenen NK-Zellen durchgeführt. Es wurden keine weiteren Messergebnisse ermittelt, da zu diesem Zeitpunkt das Troubleshooting nicht abgeschlossen war. Des Weiteren wurden auf Grund der limitierten Menge des gespendeten Probandenblutes zwei Fluoreszenzbestimmungen mit den Zellen von Proband 4 durchgeführt, welche in FKS kryokonserviert wurden. Die Werte aus der 4-fach-Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von in FKS-Medium eingefrorenen Effektorzellen fielen deutlich höher aus als die gemessenen Werte der in RPMI und 10% FKS eingefrorenen NK-Zellen.

5.5 Verifizierung und Validierung unter Verwendung verschiedener NK-Zellkonzentrationen

Der NK-Zelltoxizitätstest wurde während der Etablierungsphase mit einem konstanten Verhältnis zwischen den NK-Zellen und den K562-Zellen von 10:1 durchgeführt. In weiteren Versuchsreihen wurde die NK-Zellkonzentration variiert, um das Effektor-Targetzell-Verhältnis zu ermitteln, bei dem optimale Ergebnisse erzeugt werden.

Zu Beginn dieser neuen Versuchsreihe wurden fünf Verhältnisse, 5:1, 10:1, 25:1, 50:1 und 100:1, gewählt. Die Konzentration der K562-Zellen blieb dabei unverändert bei 40.000 Zellen/ml, die Konzentrationen der NK-Zellen variierten entsprechend den zu erzielenden Verhältnissen:

Verhältnis NK-Zellen : K562-Zellen	NK-Zellkonzentration [Zellen/ml]
5:1 (5x)	200.000
10:1 (10x)	400.000
25:1 (25x)	1.000.000
50:1 (50x)	2.000.000
100:1 (100x)	4.000.000

Für einige Probanden und den BC11 wurden die Messungen mit den fünf NK-Zellkonzentrationen durchgeführt, später wurden nur noch die Verhältnisse 10x, 25x und 50x während den Versuchsdurchführungen verwendet. An dem Beispiel BC11 (Tab. 3) ist erkennbar, dass die die NKTs bei steigenden Effektor-Targetzell-Verhältnissen zunahmen.

Des Weiteren wurden für die Validierung der drei Verhältnisse 10x, 25x und 50x Intra- (Tab. 4) und Interassays (Tab. 5, 6, 7) erstellt.

5.6 Auswirkung von Interleukin-2 auf die NK-Zelltoxizität in der Praxis

Für eine Quantifizierung der Auswirkung von IL-2 auf die NK-Zelltoxizität wurden Vergleichsmessungen durchgeführt, zum einen ohne und zum anderen mit einer Hinzugabe von IL-2 zu den Zellsuspensionen vor der dreistündigen Inkubation. Nach der Fluoreszenzendpunktbestimmung und den Berechnungen der NKTs für die meisten der Probanden (Tab. 9) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Ergebnissen ohne und mit IL-2 festgestellt werden.

5.7 Vergleich der NK-Zelltoxizitäten zwischen Messungen frisch aufbereiteter und eingefrorener Probandenblute

In der Validierungsphase wurden bei der Erstellung der Interassays die NKTs je Proband über mehrere Tage ermittelt. Aus diesem Grund mussten NK-Zellen über einen größeren Zeitraum für die Versuche zur Verfügung stehen. Da frisches Heparinblut jedoch nur maximal einen

Tag bei Zimmertemperatur gelagert werden darf, wurden die isolierten PBMCs kryokonserviert. Für eine Überprüfung, ob die Vorgänge des Einfrierens und Auftauens eine Auswirkung auf die Aktivität der NK-Zellen haben, wurden die NKTs von frisch isolierten NK-Zellen und von aufgetauten NK-Zellen gemessen (Tab. 8) und im Anschluss verglichen. Die NKTs lagen bei den Messungen mit frisch isolierten Blutzellen über den der Messungen mit aufgetauten PBMCs. Proband 3 und Proband 6 bildeten eine Ausnahme, die NKTs unterschieden sich zwischen den beiden Messungen kaum, auch bei einigen 10:1-Verhältnissen (Proband 1, 2, 9, 11) wurden keine Abweichungen festgestellt.

5.8 Etablierung von Normwerten

Die Etablierung der Normwerte wurde bei den drei Effektor-Targetzell-Verhältnissen 50x, 25x und 10x für die zytotoxischen NK-Zellaktivitäten von aufgetauten NK-Zellen durchgeführt. Die Probanden waren weiblich (w) oder männlich (m) und sie waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme zwischen 20 und 51 Jahre alt.

Proband	Geschlecht	Alter
1	w	32
2	m	27
3	w	38
4	m	32
5	w	25
6	w	20
7	w	46
8	w	32
9	w	51
10	w	26
11	w	32
12	w	33
13	m	38
14	m	21

Die NKTs liegen für jedes Verhältnis innerhalb verschiedener Grenzen:

Effektor-Targetzell- Verhältnis	Unter- und Obergrenzen [%]
10x	15 - 55
25x	25 - 90
50x	30 - 120

Aus den MWs der NKTs (siehe Interassays: Tab. 5 – 7) wurden nach Berechnungen der Gesamtmittelwerte und der STABWs die Dichtefunktionen einer Normalverteilung für jedes Verhältnis nach folgender Funktion ermittelt:

$$f(x) = \frac{1}{STABW\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-MW}{STABW}\right)^2}$$

Des Weiteren wurde ein Histogramm erstellt, für welches die NKTs eines Verhältnisses aller Probanden in Intervalle geordnet wurden, die der STABW eines VK von 15 % des MW entsprachen, sowie das 95 %-Intervall der Stichproben ermittelt.

$$VK = 15\% = \frac{STABW \cdot 100\%}{MW} \rightarrow STABW = \frac{15\% \cdot MW}{100\%}$$

6 Auswertung und Diskussion

6.1 Allgemeine Auswertung der Rohdaten

Voraussetzung zur Beurteilung der Rohdaten war, dass die maximale Lyserate mindestens doppelt so groß war wie die Spontanlyse. Damit die Rohdaten, welche diesem Kriterium entsprachen, in der Validierung des Tests und der Etablierung der Normwerte verwendet werden konnten, wurden aus den Werten der 4-fach-Bestimmung Mittelwerte errechnet.

$$MW = \frac{\sum(Rohdaten)}{4}$$

Im Anschluss an die Bildung der Mittelwerte wurden die NK-Zelltoxizitäten errechnet. Diese ergaben sich aus dem prozentualen Verhältnis des Mittelwertes des Probanden zu dem Mittelwert der Negativkontrolle abzüglich 100 Prozent.

$$NKT = \frac{MW(NK-Zellen) \cdot 100\%}{MW(Negativk.)} - 100\%$$

Für die Validierung eines Tests war es des Weiteren notwendig einen Variationskoeffizienten für NK-Zelltoxizitäten des gleichen Effektor-Target-Zell-Verhältnis eines Probanden aus mehreren Messreihen zu bestimmen. Dieser ergibt sich aus dem Verhältnis der Standardabweichung einer Stichprobe zum arithmetischen Mittel (\bar{x}) dieser NKTs multipliziert mit 100 Prozent.

$$VK = \frac{STABW}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

Die Standardabweichung einer Stichprobe beschreibt die Streuung der Messwerte vom Mittelwert und errechnet sich nach folgender Gleichung:

$$STABW = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(\bar{x} - NKT_i)^2}{n - 1}}$$

Das arithmetische Mittel entspricht dem Mittelwert der für die VK- und STABW-Berechnungen verwendeten NKT-Werte.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (NKT_i)$$

6.2 Etablierung der K562-Zellpräparationen

Aus den gemessenen NKTs wurden die Mittelwerte gebildet (Tab. 1) und anschließend für jede Probe nach dem NK-Zell-K562-Zell-Verhältnis zusammengefasst (Abb. 5). Die Höhe der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen steigt mit zunehmender NK-Zellkonzentration, da die Wahrscheinlichkeit des NK-Zell-Tumorzell-Kontakt im Medium mit größeren Zellzahlen steigt und somit prozentual mehr K562-Zellen von den NK-Zellen erkannt und lysiert werden. Die Abweichungen zwischen den drei Präparationsarten der K562-Zellen sind geringfügig, dennoch wurden mehr aufgetaute K562-Zellen lysiert. Es ist zu vermuten, dass die Vorgänge des Kryokonservierens und des Auftauens die Zellen geschwächt hatten, sodass die NK-Zellen schneller die Apoptose auslösen konnten. Die höchsten NKTs hatten die K562-Zellen, welche ohne vorheriges Färben eingefroren wurden. Es ist zu vermuten, dass das Färben mit Calcein nach dem Auftauen auf die Zellen einen größeren Stress ausübt, als wenn diese vor dem Einfrieren gefärbt worden wären.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Varianzen zwischen den einzelnen Zellpräparationen gering sind, dennoch ist die Verwendung von frischen K562-Zellen am sinnvollsten, da diese widerstandsfähiger sind als eingefrorene Zellen. Aus diesem Grund werden weiterhin vor jeder Messung die Targetzellen aus der Dauerkultur entnommen und mit Calcein gefärbt.

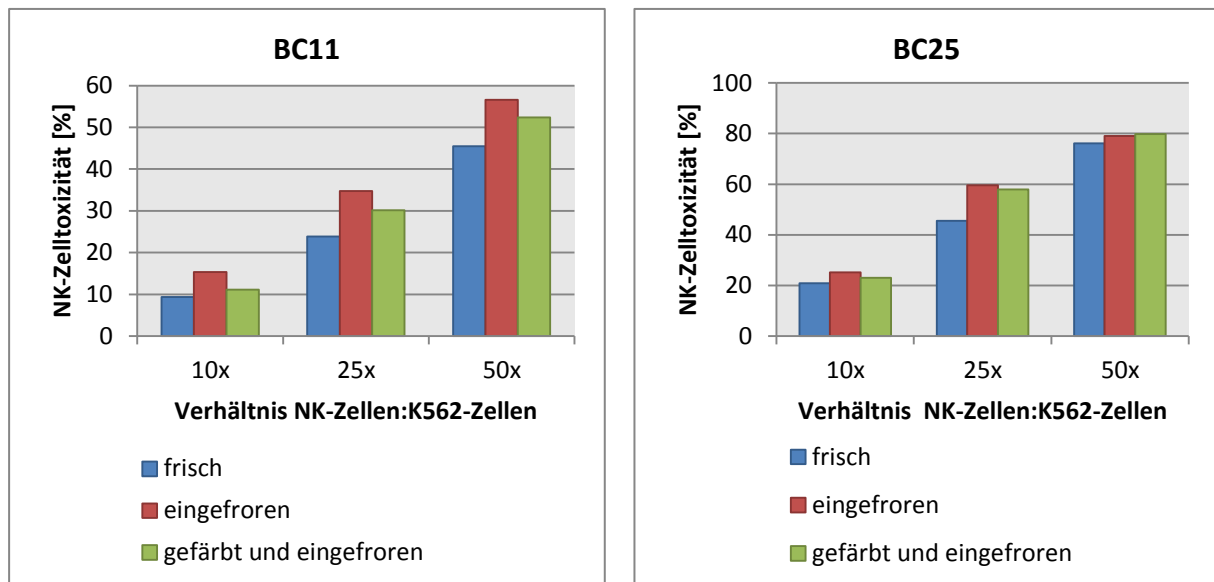


Abbildung 5: Vergleich von zytotoxischen NK-Zellaktivitäten zwischen verschiedenen präparierten K562-Zellen und BC11 bzw. BC25

6.3 Etablierung des zu verwendenden Mediums für die Kryokonservierung von PBMCs

In einer ersten Versuchsreihe zur Etablierung der Normwerte wurden nach der Entnahme der Probandenblute diese für spätere Messungen in RPMI-Medium mit 10% hitzeinaktivierten FKS eingefroren. Bei der Auswertung der NKTs nach der Fluoreszenzendpunktbestimmung wurde festgestellt, dass die Probanden bei 10x keine Werte oberhalb von 10% besaßen, was zu bedeuten hätte, dass kein Proband gesund wäre. Da dies statistisch weitestgehend ausgeschlossen war und die Probanden, soweit bekannt, zu diesem Zeitpunkt gesund waren, konnten diese Werte nicht valide sein.

Um menschliche Fehler auszuschließen, wurden die Versuchsansätze mehrfach wiederholt. Die Ergebnisse blieben jedoch unverändert. Aus diesem Grund wurde ein Troubleshooting durchgeführt. Als ersten Schritt wurden erneut Blutproben von Probanden entnommen und kryokonserviert, da die Vermutung nahe lag, dass während des Einfrierens Fehler aufgetreten waren, z.B. die PBMCs über einen zu großen Zeitraum in DMSO standen und nicht innerhalb von wenigen Minuten in den -80 °C-Gefrierschrank umgelagert wurden. Beim Auftauen der Proben wurde darauf geachtet, dass die Zellen auch hier nicht zu lang in DMSO lagerten. Im Anschluss kam es zu einer erneuten Messung. Da die Ergebnisse für die Probandenproben weiterhin unverändert blieben, wurden in einem nächsten Schritt die K562-Zellen verworfen und eine neue Dauerkultur der Zelllinie angelegt, um in einer nächsten Messreihe Mutationen innerhalb des K562-Stammes auszuschließen. Diese Messung wurde mit Probandenproben und Buffy Coats durchgeführt, während für die BC's im Vergleich mit früheren Messungen

die erwarteten Werte ermittelt wurden, blieben NKTs der Probandenproben unverändert. Bei der Vorbereitung der BCs für die Fluoreszenzmessung fiel auf, dass diese nur in FKS konserviert wurden, dementsprechend ohne eine Verwendung von dem kostengünstigeren RPMI-Medium. Demnach war zu vermuten, dass das Medium, in dem die Zellen kryokonserviert wurden, für die sehr gering ausfallenden Werte verantwortlich sein konnte. Aus diesem Grund wurden wiederholt PBMCs aus Heparinblut von Probanden isoliert und anschließend in FKS eingefroren. In Folge von weiteren Messungen mit deutlich größeren NKT-Werten wurde angenommen, dass der Fehler gefunden und behoben wurde. In Abbildung 6 wurden die NKTs von Proband 4 und 14 für die beiden Konservierungen bei 10x, 25x und 50x gegenübergestellt.

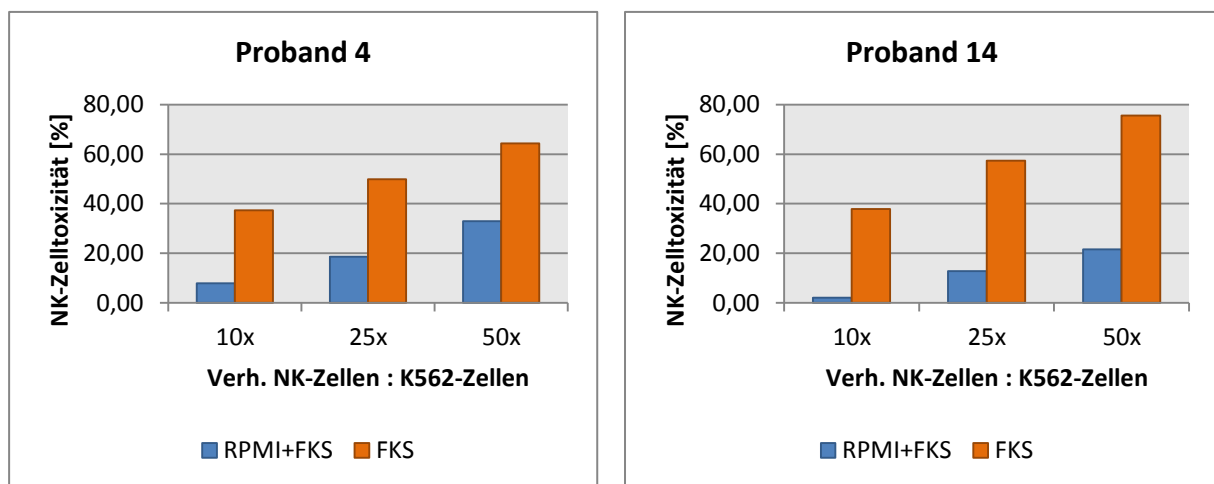


Abbildung 6: Vergleich von zytotoxischen NK-Zellaktivitäten zwischen verschiedenen Medien bei der Kryokonservierung von NK-Zellen

6.4 Verifizierung und Validierung unter Verwendung verschiedener NK-Zellkonzentrationen

Parallel zur Etablierung der Normwerte wurde die Verifizierung und Validierung des NK-Zelltoxizitätstest bei verschiedenen Effektor-Targetzell-Verhältnissen durchgeführt. Zu Beginn der Verifizierung und Validierung wurden die Fluoreszenzmessungen bei BC11 und einigen Probandenblute für 5x, 10x, 25x, 50x und 100x durchgeführt. Da die NKTs der Probandenproben auf Grund des zu diesem Zeitpunkt verwendeten Mediums für die Kryokonservierung nicht der Wahrheit entsprachen, waren die einzigen auswertbaren Messreihen die des BC11 (Abb. 7). Mit steigender NK-Zellkonzentration erhöht sich die

NKT, wie in 6.2 beschrieben. Für das Beispiel des BC11 verdoppeln sich die NKTs bei einer Verdopplung der NK-Zellkonzentration. Dabei ist das Bestimmtheitsmaß R^2 annähernd 1. Aus diesem Grund ist zu vermuten, dass in einem bestimmten Intervall ein linearer Zusammenhang zwischen den Effektorzellkonzentrationen und der NKT besteht.

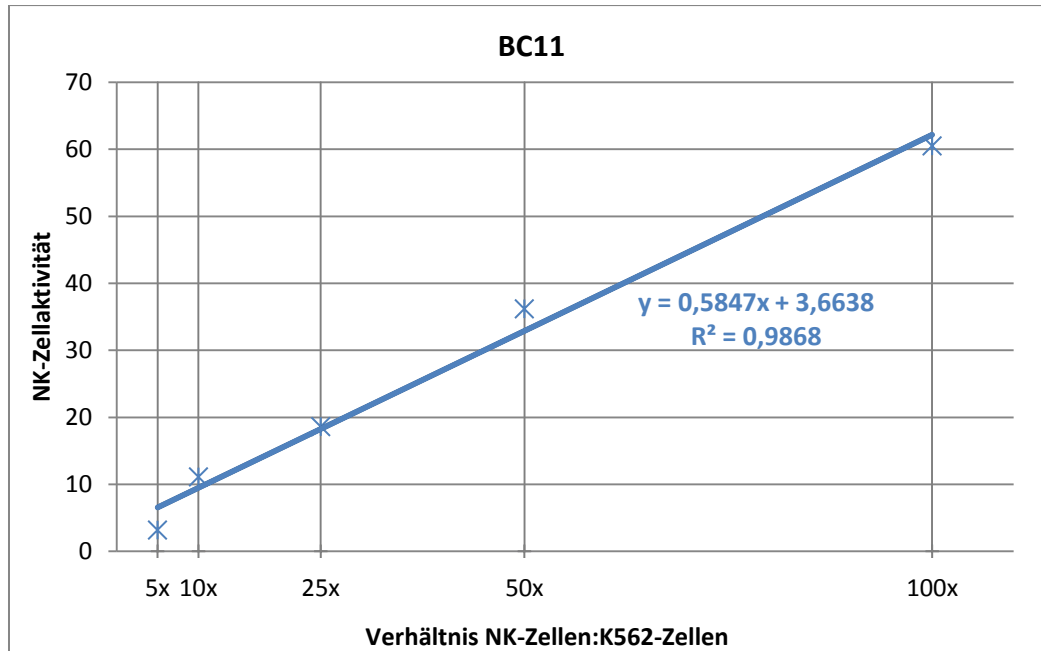


Abbildung 7: NK-Zelltoxizitäten von BC11 bei verschiedenen NK-Zell-K562-Zell-Verhältnissen

Für die Validierung des Tests wurden in weiteren Messreihen auf 5x und 100x verzichtet. Für eine NK-Zellkonzentration von 4×10^6 Zellen/ml wurde eine große Anzahl von Probandenzellen benötigt, welche für mehrere Versuchsansätze jedoch nicht zur Verfügung standen. Das Verhältnis der NK-Zellen zu K562-Zellen von 5:1 wurde ausgelassen, da die ermittelten NKTs innerhalb eines zu schmalen Intervalls lagen, wodurch eine Etablierung von Normwerten erschwert worden wäre.

Die Intraassays wurden an jedem Tag der Messung für jeden Probanden ermittelt. Die Intraassayvarianzen wurden im Allgemeinen innerhalb der Grenze von 30 ± 3 % ermittelt (Tab. 4). Interassays wurden aus den Messungen mit aufgetauten PBMC-Proben gebildet, da sich die NKTs bei der Bestimmung mit frischen Bluten im Vergleich zu aufgetauten Proben unterschieden (6.5). In Abbildung 11 wurden die Interassays am Beispiel der Probanden 5 und 13 grafisch dargestellt (Tab. 5). Für die Probanden 1, 2, 3, 5, 6, 9, 11, 12, 13 und 14 (Tab. 5, Tab. 6) waren die Variationskoeffizienten unterhalb von 30 ± 3 %, die Präzision

konnte somit als valide deklariert werden. Nur für die Probanden 7, 8 und 10 überschritten einige der berechneten Interassayvarianzen diese Grenze (Tab. 8).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Verifizierung und Validierung der NK-Zelltoxizitätstest bei 10x, 25x und 50x erfolgreich abgeschlossen wurde.

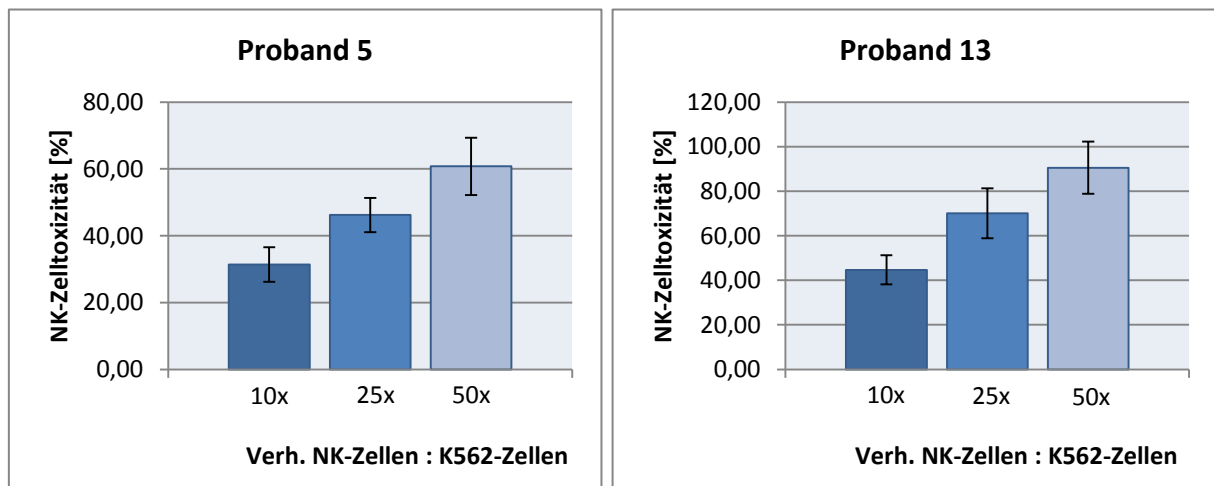


Abbildung 8: NK-Zelltoxizitäten von Proband 5 und 13 bei verschiedenen NK-Zell-K562-Zell-Verhältnissen

6.5 Auswirkung von Interleukin-2 auf die NK-Zelltoxizität in der Praxis

Das immunregulierende Zytokin IL-2 wurde schon in einigen veröffentlichten Versuchen erfolgreich zur Stimulation der zytotoxischen NK-Zellaktivität eingesetzt [37, 38]. Im Gegensatz zu den Veröffentlichungen wurde durch das Hinzufügen von IL-2 vor der dreistündigen Inkubation bei keinem der Probanden eine signifikante Steigerung der NKTs erzielt (Abb. 9). Demzufolge hatte das IL-2 bei diesen Versuchsbedingungen keine nachweisbare stimulierende Wirkung auf die NK-Zellen während des in-vitro-Tests.

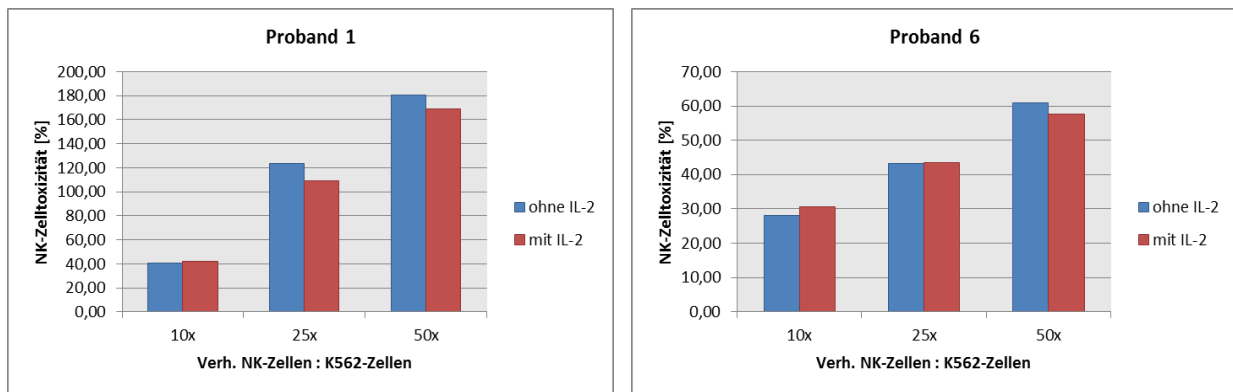


Abbildung 9: Vergleich der zytotoxischen NK-Zellaktivitäten von Proben ohne und mit IL-2 der Probanden 1 und 6

6.6 Vergleich der NK-Zelltoxizitäten zwischen Messungen frisch aufbereiteter und eingefrorener Probandenblute

Es wurden die NKTs der Fluoreszenzmessungen mit frisch isolierten und mit aufgetauten NK-Zellen verglichen. Da in den meisten Fällen höhere Werte bei den Messreihen mit frischen Blutzellen gemessen wurde (Abb. 10), ist zu vermuten, dass der Stress der Kryokonservierung und des Auftauens die NK-Zellen negativ beeinflusst und somit die zytotoxische Aktivität herabsetzt. Dass sich bei einigen Probanden die NKTs bei 10x nur geringfügig unterscheiden, wurde auf die geringere NK-Zellkonzentration zurückgeführt, da ein Aktivitätsunterschied bei wenigen Zellen einen geringeren Einfluss auf die Gesamt-NKT hat, als eine größere Zellzahl (25x, 50x). Bei den Probanden 3 und 6 wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Abb. 11). Es wird vermutet, dass die NK-Zellen dieser Probanden robuster gegenüber der Kryokonservierung und des Auftauens waren. Proband 6 nahm zum Zeitpunkt der Probenahme Medikamente, welche u.U. die NK-Zellen widerstandsfähiger machten.

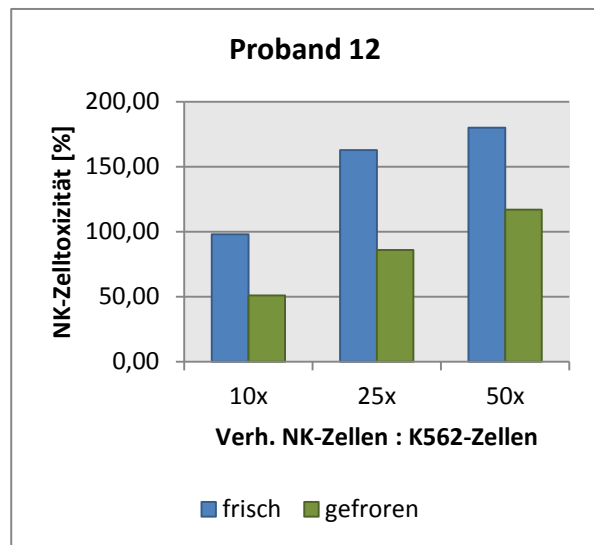
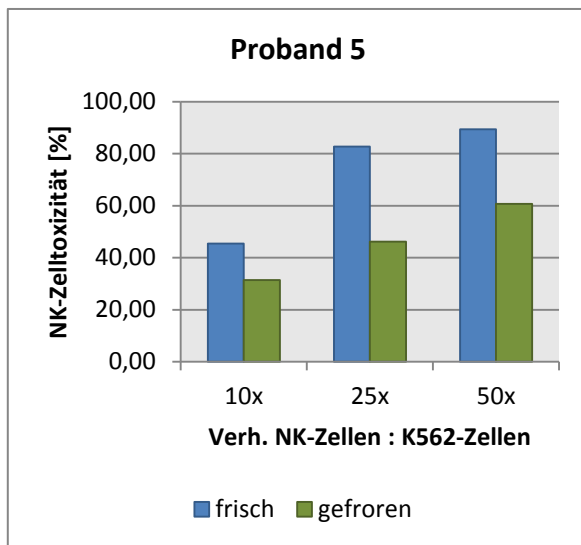


Abbildung 50: Vergleich von NK-Zelltoxizitäten zwischen Messungen mit frischen und aufgetauten NK-Zellen der Probanden 5 und 12

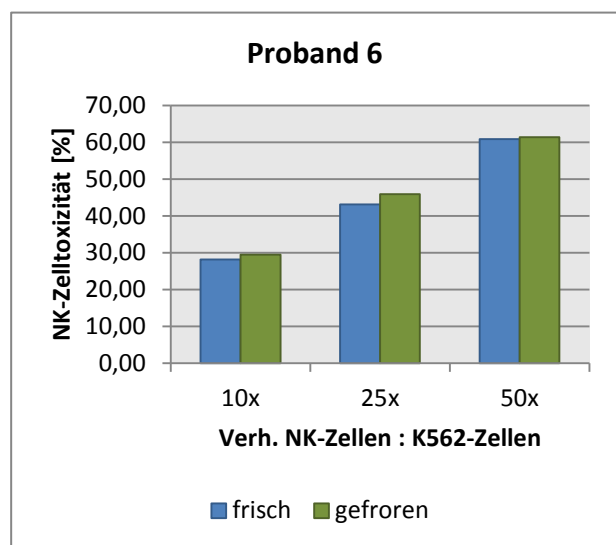
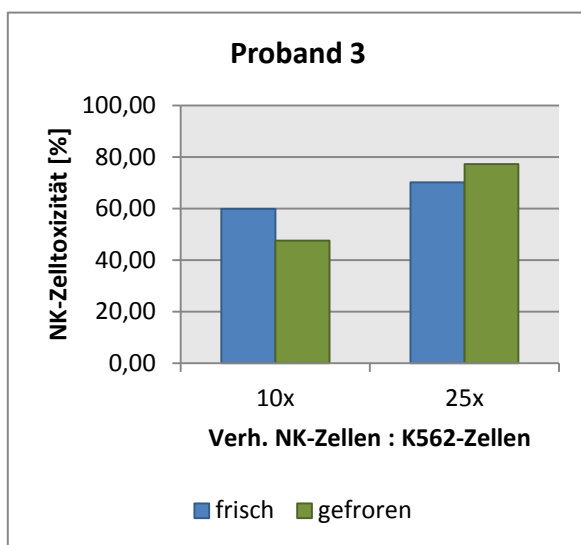
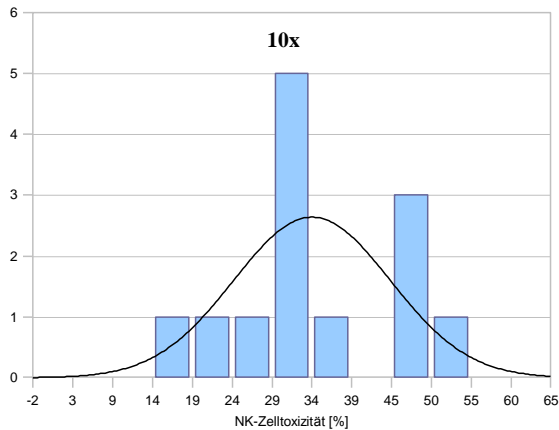


Abbildung 61: Vergleich von NK-Zelltoxizitäten zwischen Messungen mit frischen und aufgetauten NK-Zellen der Probanden 3 und 6

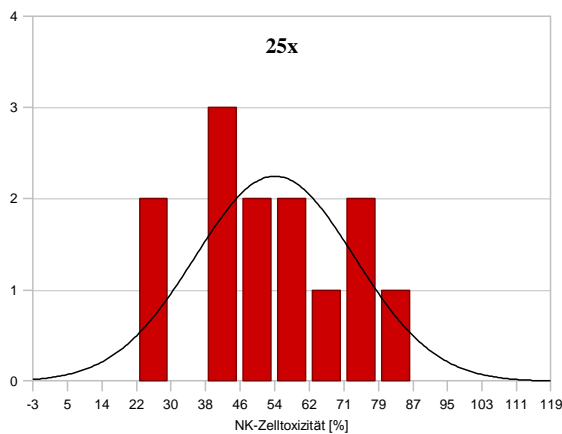
6.7 Etablierung von Normwerten

Für die Normwertetablierung wurden die Werte verwendet, welche bei Messungen mit aufgetauten NK-Zellen ermittelt wurden, und die NKTs der verschiedenen Probanden in Intervalle geordnet. Die Intervallgrenzen wurden für jede NK-Zellkonzentration neu gebildet. Vom MW aller NKTs eines Effektor-Targetzell-Verhältnisses wurden Intervalle in der Größe der STABW für einen VK von 15 % gebildet, die einzelnen NKTs diesen Intervallen zugeordnet und eine Gaußsche Verteilung erstellt (Abb. 12). Des Weiteren wurden über die 97,5 und 2,5 Perzentile, Bereiche, in denen sich p [%] der Werte aufhalten, die Ober- und Untergrenzen gesetzt, in denen 95 % der NKTs der Stichproben liegen. Das 97,5 Perzentil stellt die Obergrenze da und das 2,5 Perzentil die Untergrenze. Die ermittelten Normwerte liegen bei 10x zwischen 19,87 % und 50,05 %, bei 25x zwischen 27,08 % und 83,63 % und bei 50x zwischen 32,71 % und 113,99 %. Probanden, deren NKTs außerhalb dieser Grenzen liegen, sind nicht in 100 % der Fälle erkrankt, da ein geringer Prozentsatz (5 %) der Gesunden ebenfalls außerhalb des Referenzbereiches liegt. Überschreitet ein Messwert die Obergrenze, besitzt die Person eine überdurchschnittliche zytotoxische NK-Zellaktivität. Wird ein NKT unterhalb der Untergrenze gemessen, liegt die Vermutung nahe, dass der Proband erkrankt ist. Das globale Maximum der Normalverteilung entspricht den Mittelwerten der NKTs und verschiebt sich aus diesem Grund bei zunehmendem Effektor-Targetzell-Verhältnis entlang der x-Achse in Richtung $+\infty$. Des Weiteren nimmt die Spanne der Funktion bzw. des Referenzbereiches zu, in der ermittelte NKTs liegen können.

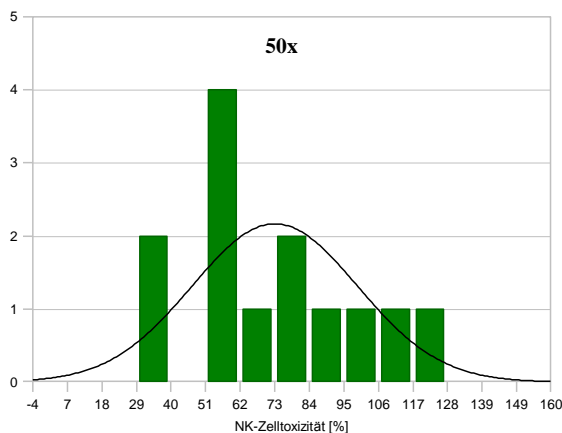
NK-Zell-K562-Zell-Verhältnis	MW [%]	STABW [%]	STABW [%] bei VK = 15%	Referenzbereiche	
				Obergrenze 97,5 Perzentile [%]	Untergrenze 2,5 Perzentile [%]
10x	34,32	10,11	5,15	50,05	19,87
25x	54,27	18,77	8,14	83,63	27,08
50x	72,90	26,18	10,93	113,99	32,71



$$f(x) = \frac{1}{10,11\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-34,32}{10,11}\right)^2}$$



$$f(x) = \frac{1}{18,77\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-54,27}{18,77}\right)^2}$$



$$f(x) = \frac{1}{26,18\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-72,90}{26,18}\right)^2}$$

Abbildung 72: Normwerte der Messungen mit aufgetauten NK-Zellen

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Normwerte erfolgreich für die verschiedenen Effektor-Targetzell-Verhältnisse, 10x, 25x und 50x, etabliert wurden. Für einen späteren Abgleich der NKT-Werte aus Patientenproben mit den Referenzbereichen sollten die Patienten-NK-Zellen vor der Durchführung des NK-Zelltoxizitätstest einige Tage bei -80 °C kryokonserviert sein.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Der NK-Zelltoxizitätstest kann nach der Erstellung der Standardarbeitsanweisung (SOP) und der Etablierung der Normwerte in dem spezialdiagnostischen Labor des Uniklinikum Leipzigs für die Beurteilung von Patientenbluten auf ihre NK-Zelltoxizität (NKT) verwendet werden. Die Verifizierung und Validierung der drei NK-Zell-K562-Zell-Verhältnisse wurden erfolgreich abgeschlossen, sodass eine Messung der NKT von Patienten für 10x, 25x und/oder 50x durchgeführt werden kann. Die Ergebnisse können im Anschluss mit den Referenzbereichen verglichen werden und es kann eine Aussage über die NK-Zellfunktionalität des Patienten getroffen werden. Die isolierten Effektorzellen sollten jedoch vor der Verwendung einige Tage in FKS und DMSO kryokonserviert werden, da die Referenzbereiche mit aufgetauten NK-Zellen etabliert wurden. Die Behandlung der NK-Zellen mit Interleukin-2 (IL-2) hatte zu keiner Steigerung der Aktivität geführt, sodass eine therapeutische IL-2-Behandlung der erkrankten Patienten nicht sinnvoll wäre.

Bei einer weiteren Optimierung des Tests könnte nach einem Medium für das Kryokonservieren gesucht werden, in dem die NK-Zellen nicht an Aktivität verlieren, oder die NK-Zellen könnten vor der Kryokonservierung vorbehandelt werden, um Schädigungen der Zellen vorzubeugen. Werden die NK-Zellen erfolgreich ohne Abnahme ihrer Aktivität eingefroren, müssen neue Normwerte etabliert werden, aber es wäre möglich sowohl mit frischen, als auch mit gefrorenen Zellen den NK-Zelltoxizitätstest durchzuführen. Um Zeit einzusparen, könnte die Kryokonservierung von vorgefärbten K562-Zellen verbessert werden, z.B. unter Verwendung von FKS-Medium anstatt RPMI und 10 % FKS, sodass eine größere Anzahl von mit Calcein gefärbten K562-Zellen in mehrere Portionen eingefroren werden könnten. Bei einem Testansatz könnten dann portionsweise die Zellen aufgetaut und ohne weitere Behandlung mit den NK-Zellen versetzt werden.

Es wäre sinnvoll den NKT-Wertepool zu vergrößern, um die Normalverteilung mit einem größeren Datensatz zu überprüfen und ggf. neue Grenzen des Referenzbereiches zu ermitteln. Um den linearen Zusammenhang der NK-Zellkonzentration zu der NKT zu überprüfen, in welchem Intervall diese Linearität bei konstanter K562-Zellkonzentration liegt und ab wann eine Stagnierung (Plateau-Phase) der NKT-Werte eintritt, können Versuchsreihen mit mehreren NK-Zellkonzentrationen durchgeführt werden.

Des Weiteren wäre es möglich die NK-Zellen über eine längere Zeitspanne mit dem IL-2 zu inkubieren oder anstelle des IL-2 eine andere Substanz zur Stimulierung der NK-Zelltoxizität

zu testen, z.B. Interleukin-15 [39] oder Interleukin-12 [40]. Bei erfolgreicher Stimulierung könnte eine Weiterentwicklung zu einer therapeutischen Form erfolgen.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mittelwerte der NK-Zelltoxizitäten (50x, 25x, 10x) bei der Etablierung der zu verwendenden K562-Zellpräparationen für BC11 und BC25

BC11	K562 frisch			K562 eingefroren			K562 gefärbt & eingefroren		
	50x	25x	10x	50x	25x	10x	50x	25x	10x
Tag 1	47,27	24,70	6,79	52,96	34,28	16,42	51,91	25,04	12,64
Tag 2	43,42	25,06	8,24	52,73	27,52	13,79	69,15	41,79	15,13
Tag 3	49,97	24,79	11,62	52,32	33,65	12,82	37,31	25,59	5,82
Tag 4	43,42	21,48	11,08	51,99	31,04	13,57	---	---	---
Tag 5	43,37	23,22	9,07	72,97	47,26	20,13	51,04	28,14	10,96
MW	45,49	23,85	9,36	56,59	34,75	15,35	52,35	30,14	11,14

BC25	K562 frisch			K562 eingefroren			K562 gefärbt & eingefroren		
	50x	25x	10x	50x	25x	10x	50x	25x	10x
Tag 1	78,00	35,66	20,86	75,85	47,64	19,25	94,63	74,53	31,38
Tag 2	93,12	59,98	18,10	73,08	57,20	23,32	67,24	43,29	16,90
Tag 3	50,40	35,87	25,63	79,48	59,45	28,47	---	---	---
Tag 4	83,00	50,67	18,60	87,66	74,17	29,80	77,61	55,77	20,91
MW	76,13	45,55	20,80	79,02	59,62	25,21	79,83	57,86	23,06

Tabelle 2: NK-Zelltoxizitäten bei der Etablierung des zu verwendenden Mediums für die Kryokonservierung von PBMC's für Proband 4 und 14

Proband 4	50x	25x	10x
RPMI + FKS	32,9	18,59	7,86
FKS	64,33	49,87	37,35

Proband 14	50x	25x	10x
RPMI + FKS	21,59	12,85	2,15
FKS	75,51	57,33	37,82

Tabelle 3: NK-Zelltoxizitäten des BC11 bei der Validierung und Verifizierung mit unterschiedlichen NK-Zellkonzentrationen (100x, 50x, 25x, 10x, 5x)

BC11	ohne IL-2						
	Negativk.	Positivk.	100x	50x	25x	10x	5x
Tag 1	2444	6768	4179	3540	3118	2937	2799
	2458	6145	3815	3193	2919	2668	2593
	2779	6451	3805	3317	2889	2722	2569
	2444	6233	3846	3352	2844	2732	2548
MW	2531	6399	3911	3351	2943	2765	2627
NK-Zelltoxizität			54,52	32,37	16,25	9,22	3,79
	mit IL-2						
	Negativk.	Positivk.	100x	50x	25x	10x	5x
	2613	6860	4592	3693	3158	2805	2746
	2600	6484	4143	3261	2936	2704	2625
	2291	6372	3790	3189	2904	2747	2713
	2267	6273	3838	3104	2799	2671	2553
MW	2443	6497	4091	3312	2949	2732	2659
NK-Zelltoxizität			67,46	35,57	20,73	11,83	8,86

BC11	ohne IL-2						
	Negativk.	Positivk.	100x	50x	25x	10x	5x
Tag 2	2624	8158	4296	3614	3031	2879	2704
	2506	8064	4237	3668	3154	2910	2626
	2569	8000	4224	3598	3036	2938	2662
	2667	8227	4492	3624	3310	2979	2639
MW	2592	8112	4312	3626	3133	2927	2658
NK-Zelltoxizität			66,40	39,92	20,89	12,93	2,56
	mit IL-2						
	Negativk.	Positivk.	100x	50x	25x	10x	5x
	2699	7994	4378	3620	3294	3106	2834
	2742	7847	4613	3701	3318	3029	2882
	2757	8010	4656	3781	3184	2951	2786
	3043	8869	4706	3974	3503	3055	2910
MW	2810	8180	4588	3769	3325	3035	2853
NK-Zelltoxizität			63,27	34,12	18,31	8,01	1,52

Tabelle 4: Intraassays - Proband 3, Messreihe 6 & Proband 12, Messreihe 2

NK-Zelltoxizität Proband 3	Messreihe 6		
	10x [%]	25x [%]	50x [%]
Messung 1	31,36	65,75	93,42
Messung 2	42,43	69,68	95,76
Messung 3	37,19	56,53	78,19
Messung 4	43,40	63,78	91,10
Mittelwert	38,60	63,94	89,62
Standardabweichung (Stichprobe)	5,54	5,51	7,85
VK	14,35	8,62	8,76
Anzahl	4	4	4
Max. erwarteter VK	30±3	30±3	30±3
Kriterium erfüllt	ja	ja	ja

NK-Zelltoxizität Proband 12	Messreihe 2		
	10x [%]	25x [%]	50x [%]
Messung 1	69,75	107,75	125,81
Messung 2	72,91	126,77	148,84
Messung 3	78,33	116,78	147,65
Messung 4	75,58	127,23	144,57
Mittelwert	74,14	119,63	141,72
Standardabweichung (Stichprobe)	3,67	9,27	10,76
VK	4,95	7,75	7,59
Anzahl	4	4	4
Max. erwarteter VK	30±3	30±3	30±3
Kriterium erfüllt	ja	ja	ja

Tabelle 5: Interassays der Probanden 5 und 13

NK-Zelltoxizität Proband 5	10x [%]	25x [%]	50x [%]
Tag 1	23,72	40,17	50,52
Tag 2	36,32	54,60	74,12
Tag 3	32,91	48,36	69,44
Tag 4	30,92	43,94	53,89
Tag 5	38,78	50,64	59,94
Tag 6	29,50	43,08	62,04
Tag 7	27,33	42,60	55,31
Mittelwert	31,35	46,20	60,75
Standardabweichung (Stichprobe)	5,17	6,20	10,04
VK	16,49	13,43	16,53
Anzahl	7	7	7
Max. erwarteter VK	30±3	30±3	30±3
Kriterium erfüllt	ja	ja	ja

NK-Zelltoxizität Proband 13	10x [%]	25x [%]	50x [%]
Tag 1	44,35	74,17	107,34
Tag 2	33,55	55,46	76,79
Tag 3	53,15	83,81	99,29
Tag 4	47,95	79,81	93,84
Tag 5	42,71	59,55	80,03
Tag 6	46,26	67,93	85,99
Mittelwert	44,66	70,12	90,55
Standardabweichung (Stichprobe)	6,52	11,22	11,75
VK	14,61	16,00	12,97
Anzahl	6	6	6
Max. erwarteter VK	30±3	30±3	30±3
Kriterium erfüllt	ja	ja	ja

Tabelle 6: Interassays der Probanden 1, 2, 3, 6, 9, 11, 12 und 14

NK-Zelltoxizität Proband 1	10x [%]	25x [%]	50x [%]
Tag 1	24,78	55,16	74,27
Tag 2	35,27	63,17	83,44
Tag 3	62,41	121,04	164,64
Tag 4	66,10	96,64	130,72
Tag 5	35,38	61,40	94,77
Tag 6	38,32	72,99	81,39
Tag 7	53,92	86,09	121,69
Tag 8	45,64	70,49	86,52
Mittelwert	45,23	78,37	104,68
Standardabweichung (Stichprobe)	14,48	21,92	31,42
VK	32,03	27,97	30,01
Anzahl	8	8	8
Max. erwarteter VK	30±3	30±3	30±3
Kriterium erfüllt	ja	ja	ja

NK- Zelltoxizität Proband 2	10x [%]	25x [%]	50x [%]
Tag 1	22,43	28,89	39,15
Tag 2	23,83	29,71	34,45
Tag 3	23,06	30,16	31,89
Tag 4	14,45	17,49	22,30
Tag 5	26,63	33,71	38,90
Tag 6	25,97	35,31	44,41
Mittelwert	22,73	29,21	35,18
Standardabweichung (Stichprobe)	4,37	6,26	7,64
VK	19,25	21,44	21,72
Anzahl	6	6	6
Max. erwarteter VK	30±3	30±3	30±3
Kriterium erfüllt	ja	ja	ja

NK- Zelltoxizität Proband 3	10x [%]	25x [%]	50x [%]
Tag 1	51,84	80,59	121,59
Tag 2	69,51	122,16	165,31
Tag 3	43,93	82,14	106,78
Tag 4	47,62	59,86	75,85
Tag 5	38,49	63,94	89,63
Tag 6	41,05	65,79	89,55
Tag 7	40,78	65,93	98,85
Mittelwert	47,60	77,20	106,79
Standardabweichung (Stichprobe)	10,68	21,57	29,60
VK	22,43	27,94	27,71
Anzahl	7	7	7
Max. erwarteter VK	30±3	30±3	30±3
Kriterium erfüllt	ja	ja	ja

NK- Zelltoxizität Proband 6	10x [%]	25x [%]	50x [%]
Tag 1	32,53	46,72	64,20
Tag 2	29,82	49,34	66,47
Tag 3	22,54	40,63	54,98
Tag 4	38,61	60,22	71,14
Tag 5	24,53	40,78	59,07
Tag 6	28,75	37,87	52,31
Mittelwert	29,46	45,93	61,36
Standardabweichung (Stichprobe)	5,76	8,20	7,18
VK	19,55	17,85	11,70
Anzahl	6	6	6
Max. erwarteter VK	30±3	30±3	30±3
Kriterium erfüllt	ja	ja	ja

NK- Zelltoxizität Proband 9	10x [%]	25x [%]	50x [%]
Tag 1	15,96	25,22	33,53
Tag 2	23,93	30,64	34,63
Tag 3	14,76	27,65	39,09
Tag 4	22,49	29,10	30,86
Tag 5	12,25	19,83	23,72
Tag 6	21,13	24,55	29,14
Tag 7	20,04	26,13	30,61
Mittelwert	18,65	26,16	31,65
Standardabweichung (Stichprobe)	4,36	3,52	4,81
VK	23,37	13,47	15,19
Anzahl	7	7	7
Max. erwarteter VK	30±3	30±3	30±3
Kriterium erfüllt	ja	ja	ja

NK- Zelltoxizität Proband 11	10x [%]	25x [%]	50x [%]
Tag 1	35,96	53,44	67,75
Tag 2	20,93	37,04	58,27
Tag 3	30,54	53,00	73,28
Tag 4	22,04	28,41	44,45
Tag 5	46,85	63,32	78,54
Tag 6	25,47	33,03	42,55
Tag 7	30,16	37,90	52,16
Tag 8	28,14	44,43	62,02
Tag 9	28,20	41,35	61,39
Mittelwert	29,81	43,55	60,05
Standardabweichung (Stichprobe)	7,84	11,17	12,23
VK	26,31	25,65	20,37
Anzahl	9	9	9
Max. erwarteter VK	30±3	30±3	30±3
Kriterium erfüllt	ja	ja	ja

NK- Zelltoxizität Proband 12	10x [%]	25x [%]	50x [%]
Tag 1	74,14	119,69	141,66
Tag 2	42,69	97,61	147,69
Tag 3	57,29	82,69	110,70
Tag 4	45,26	77,82	103,36
Tag 5	53,66	75,75	108,08
Tag 6	33,54	61,69	90,91
Mittelwert	51,10	85,88	117,07
Standardabweichung (Stichprobe)	14,06	20,22	22,52
VK	27,52	23,54	19,24
Anzahl	6	6	6
Max. erwarteter VK	30±3	30±3	30±3
Kriterium erfüllt	ja	ja	ja

NK- Zelltoxizität Proband 14	10x [%]	25x [%]	50x [%]
Tag 1	50,66	80,67	106,57
Tag 2	38,32	52,47	71,75
Tag 3	45,99	53,57	64,01
Tag 4	23,26	38,73	50,47
Tag 5	34,07	57,17	81,37
Tag 6	34,64	61,37	78,90
Mittelwert	37,82	57,33	75,51
Standardabweichung (Stichprobe)	9,68	13,75	18,89
VK	25,58	23,98	25,01
Anzahl	6	6	6
Max. erwarteter VK	30±3	30±3	30±3
Kriterium erfüllt	ja	ja	ja

Tabelle 7: Interassays der Probanden 7, 8 und 10

NK- Zelltoxizität Proband 7	10x [%]	25x [%]	50x [%]	NK- Zelltoxizität Proband 8	10x [%]	25x [%]	50x [%]
Tag 1	13,22	27,94	42,27	Tag 1	22,38	37,48	47,55
Tag 2	28,94	47,44	67,67	Tag 2	30,05	52,71	87,46
Tag 3	25,73	37,21	54,09	Tag 3	29,74	74,35	109,00
Tag 4	30,05	45,17	66,59	Tag 4	32,07	58,83	89,45
Tag 5	38,61	53,12	67,13	Tag 5	24,78	33,95	50,88
Tag 6	19,63	34,28	50,01	Tag 6	36,37	44,82	56,33
Mittelwert	26,03	40,86	57,96	Mittelwert	29,23	50,36	73,45
Standardabweichung (Stichprobe)	8,81	9,34	10,74	Standardabweichung (Stichprobe)	5,03	14,96	25,26
VK	33,84	22,85	18,54	VK	17,22	29,70	34,39
Anzahl	6	6	6	Anzahl	6	6	6
Max. erwarteter VK	30±3	30±3	30±3	Max. erwarteter VK	30±3	30±3	30±3
Kriterium erfüllt	nein	ja	ja	Kriterium erfüllt	ja	ja	nein


NK- Zelltoxizität Proband 10	10x [%]	25x [%]	50x [%]
Tag 1	41,17	64,76	70,13
Tag 2	18,64	32,72	48,26
Tag 3	43,72	89,07	125,44
Tag 4	33,73	56,14	92,30
Tag 5	26,12	37,05	50,70
Tag 6	31,51	45,99	49,08
Mittelwert	32,48	54,29	72,65
Standardabweichung (Stichprobe)	9,34	20,76	31,02
VK	28,76	38,23	42,70
Anzahl	6	6	6
Max. erwarteter VK	30±3	30±3	30±3
Kriterium erfüllt	ja	nein	nein

Tabelle 8: NK-Zelltoxizitäten der Probanden 1-14, bei 50x, 25x & 10x über einen Zeitraum von bis zu 10 Tagen

		frisch	gefroren								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Proband 1	50x	180,73	74,27	83,44	164,64	130,72	94,77	81,39	121,69	86,52	
	25x	123,70	55,16	63,17	121,04	96,64	61,40	72,99	86,09	70,49	
	10x	40,29	24,78	35,27	62,41	66,10	35,38	38,32	53,92	45,64	
Proband 2	50x	61,56	39,15	34,45	31,89	22,30	38,90	44,41			
	25x	37,10	28,89	29,71	30,16	17,49	33,71	35,31			
	10x	20,78	22,43	23,83	23,06	14,45	26,63	25,97			
Proband 3	50x	---	121,59	165,31	106,78	75,85	89,63	89,55	98,85		
	25x	70,20	80,59	122,16	82,14	59,86	63,94	65,79	65,93		
	10x	59,80	51,84	69,51	43,93	47,62	38,49	41,05	40,78		
Proband 4	50x	120,00	67,88	60,77							
	25x	101,07	53,86	45,88							
	10x	68,50	47,62	27,07							
Proband 5	50x	89,35	50,52	74,12	69,44	53,89	59,94	62,04	55,31		
	25x	82,75	40,17	54,60	48,36	43,94	50,64	43,08	42,60		
	10x	45,41	23,72	36,32	32,91	30,92	38,78	29,50	27,33		
Proband 6	50x	60,81	64,20	66,47	54,98	71,14	59,07	52,31			
	25x	43,15	46,72	49,34	40,63	60,22	40,78	37,87			
	10x	28,14	32,53	29,82	22,54	38,61	24,53	28,75			
Proband 7	50x	83,08	42,27	67,67	54,09	66,59	67,13	50,01			
	25x	65,47	27,94	47,44	37,21	45,17	53,12	34,28			
	10x	37,50	13,22	28,94	25,73	30,05	38,61	19,63			
Proband 8	50x	126,88	47,55	87,46	109,00	89,45	50,88	56,33			
	25x	99,95	37,48	52,71	74,35	58,83	33,95	44,82			
	10x	55,33	22,38	30,05	29,74	32,07	24,78	36,37			
Proband 9	50x	38,38	33,53	34,63	39,09	30,86	23,72	29,14	30,61		
	25x	32,41	25,22	30,64	27,65	29,10	19,83	24,55	26,13		
	10x	19,99	15,96	23,93	14,76	22,49	12,25	21,13	20,04		
Proband 10	50x	123,00	70,13	48,26	125,44	92,30	50,70	49,08			
	25x	98,09	64,76	32,72	89,07	56,14	37,05	45,99			
	10x	44,31	41,17	18,64	43,72	33,73	26,12	31,51			
Proband 11	50x	95,39	67,75	58,27	73,28	44,45	78,54	42,55	52,16	62,02	61,39
	25x	62,61	53,44	37,04	53,00	28,41	63,32	33,03	37,90	44,43	41,35
	10x	22,92	35,96	20,93	30,54	22,04	46,85	25,47	30,16	28,14	28,20
Proband 12	50x	180,07	141,66	147,69	110,70	103,36	108,08	90,91			
	25x	162,85	119,69	97,61	82,69	77,82	75,75	61,69			
	10x	98,06	74,14	42,69	57,29	45,26	53,66	33,54			
Proband 13	50x	110,59	107,34	76,79	99,29	93,84	80,03	85,99			
	25x	90,67	74,17	55,46	83,81	79,81	59,55	67,93			
	10x	55,82	44,35	33,55	53,15	47,95	42,71	46,26			
Proband 14	50x	---	106,57	71,75	64,01	50,47	81,37	78,90			
	25x	72,64	80,67	52,47	53,57	38,73	57,17	61,37			
	10x	51,45	50,66	38,32	45,99	23,26	34,07	34,64			

Tabelle 9: Vergleich der NK-Zelltoxizitäten von Messungen mit frischem Probandenblut ohne und mit IL-2 (bei 50x, 25x, 10x)

		frisch	
		ohne IL-2	mit IL-2
Proband 1	50x	180,73	168,87
	25x	123,70	109,06
	10x	40,29	42,14
Proband 3	50x	---	---
	25x	70,20	73,52
	10x	59,80	54,94
Proband 4	50x	120,00	122,67
	25x	101,07	100,20
	10x	68,50	65,95
Proband 5	50x	89,35	105,88
	25x	82,75	83,30
	10x	45,41	39,24
Proband 6	50x	60,81	57,71
	25x	43,15	43,51
	10x	28,14	30,52
Proband 8	50x	83,08	82,57
	25x	65,47	61,01
	10x	37,50	32,53
Proband 9	50x	126,88	128,64
	25x	99,95	91,39
	10x	55,33	47,14
Proband 10	50x	123,00	116,45
	25x	98,09	87,73
	10x	44,31	41,89
Proband 11	50x	95,39	93,44
	25x	62,61	58,45
	10x	22,92	28,88
Proband 13	50x	110,59	116,90
	25x	90,67	93,91
	10x	55,82	55,65
Proband 14	50x	---	---
	25x	72,64	67,92
	10x	51,45	50,94

 NKT's der Messungen mit IL-2

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Neubauer-Zählkammer	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildung 2: Dichtefunktion der Normalverteilung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildung 3: Dichtegradientenzentrifugation mittels LSM	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildung 4: Ausgabe der Messwerte durch SPECTRAFluor Plus	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildung 5: Vergleich von zytotoxischen NK-Zellaktivitäten zwischen verschieden präparierten K562-Zellen und BC11 bzw. BC25.....	25
Abbildung 6: Vergleich von zytotoxischen NK-Zellaktivitäten zwischen verschiedenen Medien bei der Kryokonservierung von NK-Zellen	26
Abbildung 7: NK-Zelltoxizitäten von BC11 bei verschiedenen NK-Zell-K562-Zell-Verhältnissen.....	27
Abbildung 8: NK-Zelltoxizitäten von Proband 5 und 13 bei verschiedenen NK-Zell-K562-Zell-Verhältnissen.....	28
Abbildung 9: Vergleich der zytotoxischen NK-Zellaktivitäten von Proben ohne und mit IL-2 der Probanden 1 und 6	29
Abbildung 10: Vergleich von NK-Zelltoxizitäten zwischen Messungen mit frischen und aufgetauten NK-Zellen der Probanden 5 und 12	30
Abbildung 11: Vergleich von NK-Zelltoxizitäten zwischen Messungen mit frischen und aufgetauten NK-Zellen der Probanden 3 und 6	30
Abbildung 12: Normwerte der Messungen mit aufgetauten NK-Zellen.....	32

Literaturverzeichnis

- (1) **Schölmerich, J. (2007):** *Medizinische Therapie 2007 / 2008*. 3. Aufl., Heidelberg: Springer Verlag
- (2) **Pezzutto, A., Ulrichs, T., Burmester, G. (2007):** *Taschenatlas der Immunologie. Grundlagen – Labor – Klinik*. 2. Aufl., Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG
- (3) **Ferencik, M. et al. (2006):** *Kompendium der Immunologie. Grundlagen und Klinik*. 1. Aufl., Wien: Springer-Verlag
- (4) **Hahn, H. E. et al. (2009):** *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 6. Aufl., Heidelberg: Springer Medizin Verlag
- (5) **Hiddemann, W., Bartram, C. (2010):** *Die Onkologie*. 2. Aufl., Heidelberg: Springer Medizin Verlag
- (6) **Murphy, K., Travers, P., Walport, M. (2009):** *Janeway Immunologie*. 7. Aufl., Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
- (7) **Zimmer, J. (2010):** *Natural Killer Cells. At the Forefront of Modern Immunology*. 1. Aufl., Berlin: Springer-Verlag
- (8) **Kiefel, V. (2010):** *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie. Grundlagen Therapie Methodik*. 4. Aufl., Berlin: Springer-Verlag
- (9) **Lozzio, C.B., Lozzio, B.B. (1975):** *Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome*. In: Blood 45:321-334
- (10) **Bellora, F. et al. (2010):** *The interaction of human natural killer cells with either unpolarized or polarized macrophages results in different functional outcomes*. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107:21659-21664
- (11) **Frenzel, K. (2009):** *Zytotoxizitätstest*. Diplomarbeit. Charité Berlin
- (12) **Rayhel, E.J. et al. (1988):** *Interleukin 2 and a lactogen regulate proliferation and protein phosphorylation in Nb2 cells*. In: The Biochemical journal 249:333-338
- (13) **Dingermann, T. (Hrsg.) (2002):** *Pharmazeutische Biologie. molekulare Grundlagen und klinische Anwendung*. Berlin: Springer-Verlag
- (14) **Liao, W., Lin, JX., Leonard, WJ. (2011):** *IL-s family cytokines. new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation*. In: Current opinion in immunology 23:598-604

- (15) **Knöchel, B. (2000):** *Funktionelle Regulation des "activation induced cell death" (AICD) in CD4+-Lymphozyten.* Projekt. Medizinische Hochschule Hannover. Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin. Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
- (16) SIGAM-ALDRICH Product Information – *HumanKineTM Interleukin-2, human recombinant, expressed in HEK 293 cells*
- (17) **Verfasser unbekannt:** *Sigma Product Information Sheet. Triton X-100TM.* Stand: 09.05.2011. URL:<<http://www.snowpure.com/docs/triton-x-100-sigma.pdf>> (letzter Abruf am 03.10.2011)
- (18) **Hymer, W.C., Kuff, E.L. (1963):** *Isolation of nuclei from mammalian tissues through the use of Triton X-100.* In: The journal of histochemistry and cytochemistry 12:359-363
- (19) **Verfasser unbekannt:** *Trypanblau (C.I. 23850).* Stand: 09.05.2011. URL:<<http://www.applichem.com/de/shop/produktdetail/as/trypanblau-ci-23850/>> (letzter Abruf am 03.10.2011)
- (20) **Verfasser unbekannt:** *Information über Zählkammer.* Stand: 10.05.2011. URL:<http://zaehlkammer.de/pdf/info_zaehlkammern.pdf> (letzter Abruf 03.10.2011)
- (21) **Ehlert, U., von Känel, E. (2011):** *Psychoendokrinologie und Psychoimmunologie.* 1. Aufl., Berlin: Springer-Verlag
- (22) **Prätorius, B. (2008):** *Entwicklung eines Koordinationstests für Kinder im Grundschulalter und dessen Validierung mit Hilfe biomechanischer Methoden.* 1. Aufl., Göttingen: Cuvillier Verlag
- (23) SOP 4-421 Institut für Klinische Immunologie Leipzig – *Lymphozytenpräparation*
- (24) SOP 4-422 Institut für Klinische Immunologie Leipzig – *Einfrieren humaner Lymphozyten*
- (25) SOP 4-423 Institut für Klinische Immunologie Leipzig – *Auftauen kryokonservierter humaner Lymphozyten*
- (26) **Lee-MacAry, A., Ross, E., Davies, D., Laylor, R., Honeychurch, J., Glennie, M., Snary, D., Wilkinson, R. (2001):** *Development of a novel flow cytometric cell-mediated cytotoxicity assay using the fluorophores PKH-26 and TO-PRO-3 iodide.* In: Journal of Immunological Methods 252:83-92

- (27) **Verfasser unbekannt: NKTEST®.** *Test kit for the quantification of the cytotoxic activity of natural killer (nk) cells.* Stand: 12.04.2011.
URL:<<http://www.orpegen.com/share/nktest.pdf>> (letzter Abruf 23.05.2011)
- (28) **Bratosin, D., Mitrofan, L., Pali, C., Estaquier, J., Montreuil, J. (2005):** *Novel Fluorescence Assay Using Calcein-AM for the Determination of Human Erythrocyte Viability and Aging.* In: Cytometry Part A 66A:78-84
- (29) **Roden, M., Lee, K., Panelli, M., Marincola, F. (1999):** *A novel cytolysis assay using fluorescent labeling and quantitative fluorescent scanning technology.* In: Journal of Immunological Methods 226:29-41
- (30) **Orange, J.S. et al. (2011):** *IL-2 induces a WAVE2-dependent pathway for actin reorganization that enables WASp-independent human NK cell function.* In: The Journal of Clinical Investigation 121:1535-1548
- (31) SOP 1-015 Institut für Klinische Immunologie Leipzig – *Validierung neuer Untersuchungsverfahren (Tests in Eigenherstellung)*
- (32) Interassay Canto Institut für Klinische Immunologie Leipzig – *Oxidativer Burst*
- (33) Intraassay Canto Institut für Klinische Immunologie Leipzig – *Oxidativer Burst*
- (34) SOP 1-001 Institut für Klinische Immunologie Leipzig – *Erstellung, Verwaltung und Pflegen von Standardarbeitsanweisungen (SOPs)*
- (35) **DAkKS:** *Welche Aufgabe hat die DAkKS?.* Stand: 22.09.2011.
URL:<<http://www.dakks.de/content/welche-aufgabe-hat-die-dakks>> (letzter Abruf 03.10.2011)
- (36) **Internationale Organisation für Normung (2007):** *Medizinische Laboratorien - Besondere Anforderungen an die Qualität und Kompetenz.* DIN EN ISO 15189:2007
- (37) **Lang, P. et al. (2011):** *Natural killer cell activity influences outcome after T cell depleted stem cell transplantation from matched unrelated and haploidentical donors.* In: Best practice & research. Clinical hematology 24:403-411
- (38) **Weigent, D.A., Stanton, G.J., Johnson, H.M. (1983):** *Interleukin 2 enhances natural killer cell activity through induction of gamma interferon.* In: Infection and immunity 41:992-997
- (39) **Buddingh, E.P. et al. (2011):** *Chemotherapy-resistant osteosarcoma is highly susceptible to IL-15-activated allogeneic and autologous NK cells.* In: Cancer Immunology, Immunotherapy 60:575-586

- (40) **Xu, M. et al. (2010):** *Regulation of Antitumor Immune Responses by the IL-12 Family Cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27.* In: Clinical and Developmental Immunology pii:832454

Anhang

Alle übrigen Tabellen und Diagramme, die nicht in der Arbeit abgedruckt wurden, befinden sich auf der beigefügten CD-ROM.